



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ KVALITATIVNÍCH
UKAZATELŮ KAKAOVÉHO PRÁŠKU**

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF QUALITATIVE PARAMETERS OF COCOA
POWDER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Petra Vránová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1321/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Petra Vránová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vývoj metody pro stanovení kvalitativních ukazatelů kakaového prášku

Zadání diplomové práce:

Literární část:

- 1) Stručná botanická charakteristika kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*)
- 2) Biologicky aktivní látky obsažené v plodech kakaovníku
- 3) Technologie zpracování kakaových bobů a jejich využití v potravinářství
- 4) Popis instrumentace HPLC

Experimentální část:

- 1) Ověření analytické metody pro stanovení kofeinu a theobrominu technikou HPLC
- 2) Úprava vzorku pro analýzy
- 3) Analýza reálného vzorku kakaového prášku
- 4) Zpracování dat a vyhodnocení

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Petra Vránová
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na stručnou botanickou charakterizaci kakaovníku pravého a jsou také uvedeny jeho nejznámější odrůdy. Dále je popsáno chemické složení kakaových bobů s důrazem na theobromin a kofein. Je zmíněna i technologie zpracování kakaových bobů na kakaovou hmotu a kakaový prášek, které jsou pak dále využívány potravinářském průmyslu. Součástí je také krátký popis legislativních požadavků vztahujících se ke kakau. V této části práce jsou také uvedeny dvě kapitoly věnované popisu instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Experimentální část se zabývá analýzami kakaového prášku, kakaových bobů, kakaové hmoty a odpadní drti z kakaových bobů prodávané jako „čajová směs“. V uvedených surovinách bylo stanoveno celkem 10 legislativou doporučených parametrů, např. obsah kofeinu, theobrominu a sacharózy, obsah těžkých kovů a draslíku, obsah tuku a další. Nejvyšší obsah theobrominu byl stanoven v kakaovém prášku $178,363 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kofeinu v kakaových bobech $16,096 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Všechny analyzované vzorky obsahovaly dle očekávání malé množství sacharózy, nejvíce jí bylo nalezeno ve vzorcích čajové směsi jak u stanovení vzorku ve směsi voda:ethanol $84,069 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, tak v roztoku vzorku ve vodě $65,897 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

ABSTRACT

The theoretical part of the master's thesis is focused on a brief botanical characterization of the cacao tree and its most famous varieties discussed. Furthermore, the chemical composition of cocoa beans is described with an emphasis on theobromine and caffeine. There is also mention of the cocoa beans the cocoa bean processing technology for cocoa liquor and cocoa powder, which are then used in food industry. Additionally there is a short description of the legal requirements relating to cocoa. In this part are also two chapters are devoted to the description of instrumentation of high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The experimental part deals with analyzes of cocoa powder, cocoa beans, cocoa liquor and waste cocoa beans sold as a "tea mixture". A total of 10 legislation-recommended parameters have been identified in the listed raw materials, such as caffeine, theobromine and sucrose, heavy metal and potassium, fat content etc. The highest content of theobromine was determined in cocoa powder $178.363 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, caffeine in cocoa beans $16.096 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. All samples analyzed contained a little amount of sucrose as expected, the highest concentration was found in the tea mixture samples in both the water: ethanol sample of $84.069 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, and the sample solution in water of $65.897 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

KLÍČOVÁ SLOVA

Theobroma cacao, kakaové boby, theobromin, kofein, HPLC, ICP-OES

KEYWORDS

Theobroma cacao, cocoa beans, theobromine, caffeine, HPLC, ICP-OES

VRÁNOVÁ, Petra. *Vývoj metody pro stanovení kvalitativních ukazatelů kakaového prášku*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113372>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Milena Vespalcová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, konzultace a za čas, který mi věnovala. Nakonec bych chtěla poděkovat rodičům, přátelům a všem, kteří mě podporovali a pomohli k vytvoření práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	<i>Kakaovník pravý.....</i>	8
2.1.1	Pěstování kakaovníku.....	8
2.1.2	Odrůdy.....	10
2.1.2.1	Criollo.....	11
2.1.2.2	Forastero	11
2.1.2.3	Trinitario	11
2.2	<i>Kakaové boby.....</i>	11
2.2.1	Biologicky aktivní látky obsažené v plodech kakaovníku	12
2.2.1.1	Alkaloidy s purinovým jádrem – theobromin, kofein	13
2.2.1.2	Minerální látky.....	14
2.3	<i>Technologie zpracování kakaových bobů a jejich využití v potravinářství</i>	15
2.3.1	Sklizeň	15
2.3.2	Fermentační procesy	15
2.3.3	Sušení.....	16
2.3.4	Další kroky zpracování	16
2.3.4.1	Výroba čokoládové hmoty	16
2.3.4.2	Výroba kakaového prášku a kakaového másla	17
2.4	<i>Legislativní požadavky</i>	19
2.5	<i>Použité analytické metody.....</i>	20
2.5.1	Stanovení obsahu vody	20
2.5.2	Vážkové stanovení popela (minerálních látek).....	20
2.5.3	Stanovení alkality popela.....	21
2.5.4	Stanovení celkového obsahu lipidů	21
2.5.5	Stanovení celkového dusíku.....	21
2.5.5.1	Princip metody a retenční charakteristiky.....	22
2.5.5.2	Popis chromatografu.....	23
2.5.6	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP–OES)	26
2.5.6.1	Popis ICP–OES spektrometru	27
2.5.6.2	Systém zavádění vzorku	27
2.5.6.3	Generátor vysokofrekvenčního proudu	28
2.5.6.4	Spektrometr	28
3	Cíle práce.....	30
4	Experimentální část.....	31
4.1	<i>Materiál.....</i>	31
4.1.1	Testované vzorky.....	31
4.1.2	Koncentrační řady použitých kalibračních křivek	33
4.1.3	Přístroje a pomůcky	33

4.1.4	Chemikálie	33
4.1.5	Roztoky	34
4.2	<i>Metody</i>	34
4.2.1	Nepřímé stanovení vody metodou sušení	34
4.2.2	Vážkové stanovení popela	34
4.2.3	Stanovení alkality popela.....	35
4.2.4	Stanovení tuku pomocí automatického extraktoru Soxtherm.....	37
4.2.5	Stanovení theobrominu a kofeinu pomocí HPLC	37
4.2.6	Stanovení tukuprosté kakaové sušiny	38
4.2.7	Stanovení sacharózy pomocí HPLC.....	38
4.2.8	Stanovení celkového dusíku.....	39
4.2.9	Stanovení draslíku	42
4.2.10	Stanovení toxických prvků (Cd, Cu)	42
5	Výsledky a diskuze	44
5.1	<i>Nepřímé stanovení vody metodou sušení</i>	44
5.2	<i>Vážkové stanovení popela</i>	44
5.3	<i>Stanovení alkality popela</i>	45
5.4	<i>Stanovení tuku pomocí automatického extraktoru Soxtherm</i>	46
5.5	<i>Stanovení theobrominu a kofeinu pomocí HPLC</i>	47
5.6	<i>Stanovení tukuprosté kakaové sušiny</i>	51
5.7	<i>Stanovení sacharózy pomocí HPLC</i>	51
5.8	<i>Stanovení celkového dusíku</i>	52
5.9	<i>Stanovení draslíku</i>	54
5.10	<i>Stanovení toxických prvků (Cd, Cu)</i>	55
6	Závěr	57
7	Použité zdroje	58
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	62

1 ÚVOD

Kakaovník pravý (*Theobroma cacao* L.) je rostlinou rostoucí v tropickém klimatickém pásu. Jeho plodům se přezdívá hnědé zlato, protože jde o surovinu ekonomického aspektu. Lidé po celém světě si vychutnávají kakaové produkty v nejrůznějších formách. Jedním z důvodů, proč je konzumace kakaa tak oblíbená, může být obsah bioaktivních látek v plodech kakaovníku, které působí na zdravotní stav člověka. Mezi jedny z mnoha látek patří purinové alkaloidy theobromin a kofein, které svým obsahem dávají celkový pohled na kakaové produkty. Tyto produkty jsou v potravinářství využívány při výrobě cukrovinek. Známe jsou také v oblasti zdravé výživy, kde je můžeme najít jako exotické produkty, které díky svému obsahu kakaového másla nebo minerálních látek lze konzumovat jako oříšky. Další uplatnění můžeme hledat ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

Cílem práce je vypracovat stručnou botanickou charakteristiku kakaovníku pravého, popsat biologicky aktivní látky v jeho plodech a zpracovat přehled technologie zpracování a využití kakaových bobů v potravinářství. Dále uvést a popsat instrumentální metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

Díky metodě ICP-OES můžeme posoudit analyzované vzorky z hlediska bezpečnosti potravin, která je v současné době velmi aktuální. Díky legislativním požadavkům můžeme mít srovnání produktů. Ke stanovení analyzovaných parametrů se využívá nejrůznějších metod. V rámci práce byla pozornost věnována analytickým metodám, které se běžně používají v laboratorní praxi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kakaovník pravý

Kakaovník pravý (*Theobroma cacao* L.) je typická rostlina tropického pásu pocházející z povodí Horní Amazonie, která se rozkládá na východních svazích And. Jeho migrace na sever do Středí Ameriky a Mexika sice byla ztracena v historii, ale díky vývoji moderních molekulárně diagnostických technik můžeme dokumentovat fylogenetické vztahy mezi současnými genetickými zdroji, jako jsou např. semena nebo tkáně. V pre-hispánských dobách se pěstování kakaa a zpracování kakaových bobů vyvinulo do různých technologií, kdy do jisté míry právě pěstování bylo uznávané jako jeden z nejsložitějších agrolesních systémů. Kakaová semena neměla jen náboženský, obřadní a léčivý význam. Uplatnění také našla v opojném nápoji nebo se používala jako společné platidlo Olméků, Mayů a Aztéků [1].

Kakao bylo nejdříve představeno španělskému králi Karlu V. Původně kyselý až štiplavý nápoj nenašel cestu ke španělskému obyvatelstvu. Nicméně se dostal do španělských klášterů, kde byl smíchán s cukrem a kořením a tento recept tak zůstal na dlouhá léta tajemstvím. Nakonec se z *xocolatl* neboli „hořká voda“ stalo kakao, které je tak oblíbené u mnoha kultur po celém světě [1; 2].



Obrázek 1 Příklad plodů kakaovníku pravého z oblasti Bali (převzato a upraveno podle Ulyana Kapiton)

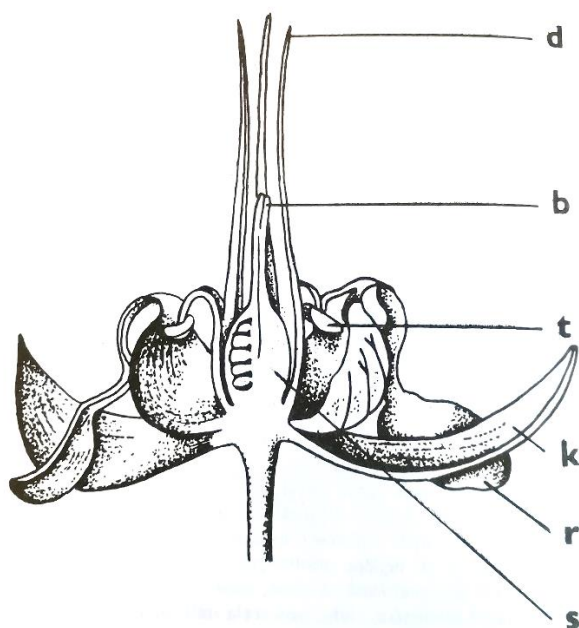
2.1.1 Pěstování kakaovníku

Kakaovník je poměrně náročná rostlina na pěstování. Je to stálezelený strom, který roste jen v tropickém pásmu mezi 20. stupněm severní šířky a 20. stupněm jižní šířky. Pro úspěšné pěstování je ideální teplota okolo 21-25 °C. Pro kakaovník je charakteristické, že bývá obklopen jinými rostlinami, které mu poskytují dostatečný stín, protože nesnáší přímé sluneční

záření. Dobře roste v nadmořské výšce mezi 400-1 250 m a vyžaduje po celý rok nejméně 67-70 % vlhkosti. Po asi třech letech už strom dosahuje výšky 4-5 m a po deseti letech až 8-10 m [3; 4].

Listy kakaovníku jsou střídavé, které mají v mládí bronzově červenou barvu a později jsou tmavě zelené. Jejich čepel je 15-20 cm dlouhá a mají podlouhlý eliptický tvar [3; 5].

Zajímavostí u kakaovníku je tzv. kauliflorie, což je schopnost některých rostlin vytvářet květy, květenství a plody přímo na hlavních větvích nebo přímo na kmeni. Drobné květy mívají bílou, nažloutlou až narůžovělou barvu. Květy jsou tvořeny deseti tyčinkami, které vytvářejí soustředné kruhy. Pět tyčinek vnějšího kruhu je neplodných a jsou přeměněny na tzv. staminodia (=patyčinka – zakrnělá tyčinka bez prašníku). Tyčinky ve vnitřním kruhu mají krátké nitky a prašníky, které jsou otevírány ven z květu. Pestík má jednoduchou čnělku. Na obrázku 2 je znázorněn průřez květem kakaovníku [3; 5; 6].

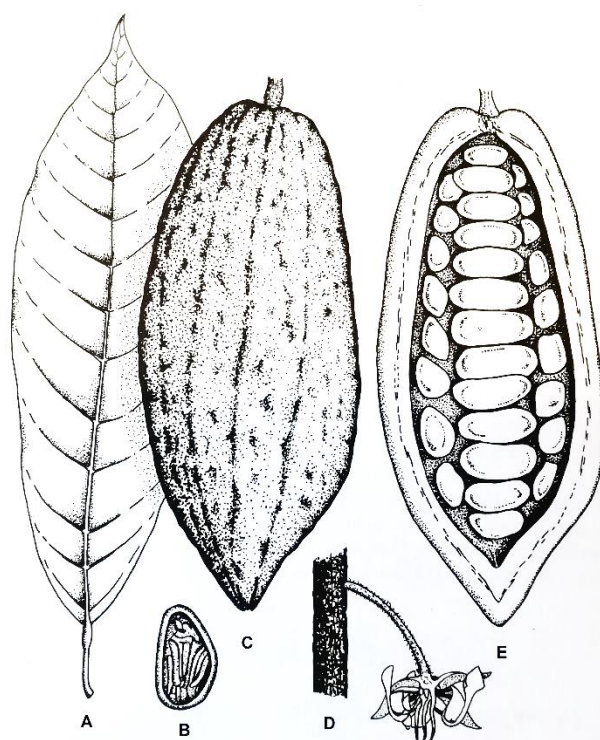


Obrázek 2 Květ kakaovníku – podélný řez

Pod písmeny jsou popsány jednotlivé části květu: b – blizna, d – staminodia, k – kalich, r – koruna, s – semeník, t – tyčinky
(převzato a upraveno podle [3])

Obvykle začíná kakaovník nasazovat na květ třetím rokem, když má příznivé podmínky. Plná plodnost je nejdříve za 6-7 let a trvá až do 40. roku života. I přestože kakaovník poměrně bohatě kvete, tak se plodů rodí málo, protože převážná část květů není opylena a po odkvetení odpadne. Opyleno bývá 5-40 % květů. Na stromech se urodí přibližně 25-50 plodů [3; 6].

Plody jsou žlutozelené, oranžové nebo hnědé nepukavé podélně zbrázděné bobule, které dozrávají asi čtyři měsíce po opylení. Jejich hmotnost je obvykle okolo 450 g, jsou 6-12 cm široké a 10-25 cm dlouhé. Zralé plody kakaovníku samy neopadávají ani se neotvírají. To je práce člověka nebo zvířete. Uvnitř plodu se nachází bílá až narůžovělá nakyslá sladká dužnina, ve které je uloženo 15-40 semen v pěti podélných řadách. Kakaovník plodí po celý rok, v němž jsou dvě hlavní sklizně, a to v květnu a listopadu. Kakaovým bobům je dále věnována kapitola 2.2. Botanické zařazení do taxonomického systému je uvedeno v tabulce 1 [3; 5; 6].



Obrázek 3 Botanické části kakaovníku pravého
A – list, B – podélný řez semenem, C – plod, D – květ, E – podélný řez plodem
(převzato a upraveno dle [3])

Tabulka 1 Taxonomické zařazení kakaovníku pravého [7]

Taxonomie: Kakaovníku pravého <i>Theobroma cacao</i>		
Říše	Rostliny	<i>Plantae</i>
Podříše	Cévnaté rostliny	<i>Tracheobionta</i>
Oddělení	Krytosemenné	<i>Magnoliophyta</i>
Třída	Vyšší dvouděložné	<i>Rosopsida</i>
Řád	Slézovité	<i>Malvales</i>
Čeleď	Lejnicovité	<i>Malvaceae</i>
Rod	Kakaovník	<i>Theobroma</i>

2.1.2 Odrůdy

Nejčastěji jsou pěstovány dva poddruhy *Theobroma cacao*: *T. cacao* var. *cacao* a *T. cacao* var. *sphaerocarpum*. Tyto odrůdy jsou uznávány v celosvětovém obchodu s kakaem. Úsilí o zařazení komerčně významných kakaových genotypů začalo již v 19. století a jsou rozděleny do tří genetických skupin: Criollo, Forastero a Trinitario [1; 8].

Využitím specifických vlastností jednotlivých genotypů je klíčovým faktorem pro jejich použití. Nicméně molekulární techniky provedly identifikaci až 10 kakaových genotypových

kategorií, a proto se současná taxonomie může v budoucnu ještě změnit. Obchodníci a pěstitelé rozlišují kakaovníky podle kvality semen do tří druhů, které jsou uvedeny v následujících kapitolách [1; 4; 9].

2.1.2.1 Criollo

Pro druh Criollo je charakteristická vysoká kvalita semen a výrobků, na druhou stranu se na trhu objevují jen zřídka kvůli nízkým výnosům a obtížnějšímu pěstování rostliny. Jde o ušlechtilý druh kaka, původem převážně z Venezuely. Kakaovníky jsou náchylné k chorobám, produkují malou úrodu, ale jejich boby mají intenzivní aroma. V dnešní době pěstování kakaovníků Criollo tvoří 2-5 %. Odborníci z oblasti agronomie tvrdí, že z tohoto typu kakaovníku pochází méně než 1 % celosvětové produkce kaka. Současné kakaovníky nejsou vlastně čisté Criollo, ale jde o hybrid typu Criollo a typu Trinitario. V současné době se odrůda pěstuje hlavně v Mexiku a Venezuele, ale nachází se také v Dominikánské republice, Peru, Kolumbii, Nové Guineji, Jávě a Madagaskaru. Mezi známé poddruhy patří: Porcelana, Chuao, Ocumare nebo Guasare [1; 4; 6].

2.1.2.2 Forastero

Jedná se o nejrozšířenější, nejodolnější a o nejvýnosnější kakaovník. Avšak má tento typ nejméně aromatické boby a patří do méně ušlechtilé skupiny. Evropané začali tento kakaovník pěstovat na plantážích v koloniích na počátku 20. století, když vzrostla poptávka po čokoládě. Semena a výrobky z Forastera patří ke kvalitním a představuje 90 % veškeré světové produkce. V dnešní době většina sklizně pochází z Ghany, Pobřeží slonoviny, Sao Tomé, Togo, Nigérie, Brazílie, Indonésie a Malajsie. Rozšířenými poddruhy jsou např. Amelonado či Arriba [1; 4; 6].

2.1.2.3 Trinitario

Jde o křížence druhů Criollo a Forastero. Spojuje v sobě přednosti obou druhů – je odolný, boby jsou aromatické a poskytuje dobré výnosy. Považuje se za ušlechtilý druh kaka. Stromy Trinitaria byly původně pěstovány na Trinidadu. V současnosti je rozšířeno pěstování ve Venezuele a Ecuadoru, Kamerunu, Samoi, Sri Lance, Jávě a Nové Guineji [1; 4; 6].

2.2 Kakaové boby

V luscích kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*) se nacházejí semena, která nazýváme kakaové boby, jiným názvem nibs (označení pro drcená a opražená jádra bobů). Vyvívají se uvnitř tobolek, která přirůstá ke kmeni a k větvím stromu. Uvnitř tobolek se nachází 5 svislých řad semen a každá řada může obsahovat 4-12 semen obalených dužninou. Kakaové boby jsou velké přibližně dva centimetry a jsou mandlového tvaru. Osemení je bílé a na průřezu mají bílou, nažloutlou nebo nahnědlou barvu. Tato semena se využívají na výrobu kakaového prášku a kakaových produktů, jako jsou cukrovinky nebo čokolády. Kakaové boby jsou obaleny aromatickou, slizovitou dření. Tato dřeň prochází fermentací a řídí chemické změny uvnitř bobů, např. může měnit zbarvení, vůni, a především chuť výsledných produktů [3; 6; 10].

Kakaové boby obsahují látky nazývané methylxanthiny, kam zejména patří theobromin a kofein. Chemické složení pražených kakaových bobů je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2 Chemické složení kakaového prášku, pražených kakaových bobů a kakaové hmoty [11]

Složka	Kakaový prášek [hm.%]	Pražené kakaové boby [hm.%]	Kakaová hmota [hm.%]
Sušina	94,50	93,21	96,75
Voda	5,50	7,93	4,25
Popel	5,77	4,16	3,26
Tuk	20,46	46,19	53,14
Dusíkaté látky	22,31	14,23	13,96
Vláknina	6,35	4,63	3,97
Škrob	14,37	6,06	9,00
Theobromin	2,51	1,58	1,58

Kakaové máslo (KM) tvoří 50-55 % hmotnosti kakaového bobu. Pod pojmem kakaové máslo se označuje světle žlutý tuk s charakteristickou chutí a vůní čokolády, který je získáván lisováním kakaových bobů [3; 6].

Díky složení mastných kyselin má kakaové máslo charakteristické vlastnosti, které se projevují v ústech chladivým účinkem. Obsahuje nasycené mastné kyseliny jako je kyselina palmitová, stearová, myristová, arachidonová a laurová, které tvoří 57–64 % z celkového množství mastných kyselin. Mezi přítomné nenasycené mastné kyseliny patří kyselina olejová, palmitoolejová, linoleová ad., které představují 36-43 %. Vlastnosti KM jsou převážně závislé na jeho složení triacylglycerolů mezi něž patří: 1-palmito-3-stearo-2-olein, 1,3-distearo-2-olein a 1,3-dipalmito-2-olein. Kakaové máslo má ostrý bod tání, který se pohybuje od 27 do 35 °C. Zvláštností KM je to, že v tuhém stavu není na dotek mastné. KM může krystalizovat do několika forem, z nichž nejvyužívanější v čokoládovém průmyslu je forma β , jejíž bod tání se pohybuje okolo 35-37 °C [12].

Používá se jako důležitá složka čokolád a čokoládových výrobků, ale své uplatnění našlo i v kosmetickém průmyslu, kde se díky hydratačním vlastnostem využívá při výrobě mýdel nebo díky antioxidačním vlastnostem zase u přípravků na pleť proti stárnutí [11; 12].

2.2.1 Biologicky aktivní látky obsažené v plodech kakaovníku

Bioaktivní látky v plodech kakaovníku mohou ovlivnit zdravotní stav člověka, především díky sekundárním metabolitům přítomným v těchto zdrojích. Tyto sloučeniny, označované také jako fytochemikálie, mají důležitou roli v naší stravě, protože mají antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Fenolové sloučeniny se vyznačují všudypřítomným výskytem v rostlinných tkáních a patří mezi nejdůležitější fytochemikálie, které z nich činí důležité antioxidační zdroje [1; 13].

Alkaloidy a fenolické sloučeniny patří mezi nejdůležitější sekundární metabolity. Kromě alkaloidů a různých fenolických látek najdeme tyto metabolity ve více než 300 různých složek včetně dalších mastných kyselin olejové, stearové a palmitové v kakaovém másle a minerálů, jako je hořčík, draslík, železo a zinek. V současné době je věnována zvláštní pozornost polyfenolům z důvodu jejich antioxidačních vlastností a jejich potenciálního protizánětlivého a kardioprotektivního působení [14; 15; 16].

Polyfenoly v kakaových bobech jsou uloženy v pigmentových buňkách kotyledonů (embryonální část semene). V závislosti na množství anthokyaninů (pigmentové buňky) se tyto

pigmenty pohybují v barevné škále od bílé po tmavě purpurovou. Lze rozlišovat tři hlavní skupiny fenolů: flavanoly (flavan-3-oly), prokyanidiny a anthokyany. Dalšími sloučeninami, které jsou přítomné v kakaových bobech, jsou flavony a fenolové kyseliny [2; 17].

Kromě toho se v kakaových produktech nacházejí také malá množství quercetinu, naringingu, luteolinu, apigeninu, clovamidu a fenolových kyselin (jako je kofeinová, ferulová, gallová a p-kumarová) [1].

2.2.1.1 Alkaloidy s purinovým jádrem – theobromin, kofein

Alkaloidy patří mezi dusíkaté báze, které jsou obsažené převážně v rostlinách, ale nalezneme je v těle některých živočichů jako produkty metabolismu aminokyselin. Rostliny si dusík (limitující faktor růstu) uchovávají v různých zásobních látkách, mezi které patří právě uvedené alkaloidy [18; 19].

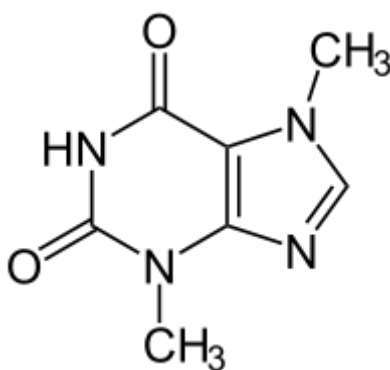
Struktura theobrominu a kofeinu vychází z purinu, respektive z jednoho z jeho mnoha derivátů – xanthinu. Methyloací pak vzniká skupina methylxanthinů mezi, než řadíme právě zmíněný theobromin a kofein [18].

Tyto sloučeniny nejsou v průběhu zpracování degradovány, a proto jsou jedním z ukazatelů určení obsahu kakaa. Obsah alkaloidů v kakaových bobech závisí na druhu a místě, odkud pocházejí [1; 20]

- **Theobromin (3,7 – dimethylxantin)**

Theobromin patří mezi jeden z hlavních purinových alkaloidů, který se vyskytuje v kakaových bobech a který je známý svými stimulačními účinky na centrální nervový systém. Mezi další vlastnosti patří schopnost rozšiřování cév a působí jako diuretikum. Molekulová hmotnost theobrominu je $180,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [21]. Theobromin je syntetizován z kofeinu a představuje nejdůležitější methylxanthin v kakau a čokoládě. Jeho koncentrace může dosáhnout až 2,4 % suché hmotnosti, zatímco kofein může dosahovat pouze 0,24 %. Theobromin lze nalézt také v čaji [1; 20].

Theobromin se velmi absorbuje v tenkém střevě a jeho metabolická dráha je dobře známa. Nemodifikovaný theobromin lze nalézt v moči, a dokonce i ve výkalech. Maximální koncentrace theobrominu v plazmě, po příjmu čokolády, nastává přibližně 2 hodiny po požití, což naznačuje, že je zcela absorbován v tenkém střevě, jak bylo uvedeno výše. Jeho biologická dostupnost a vysoké hladiny v kakau umožňují nalézt mikromolární koncentrace v krevní plazmě po konzumaci malého množství kakaa [1; 20]. Struktura theobrominu je zobrazena na obrázku.

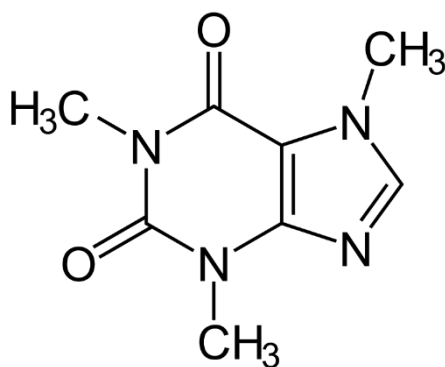


Theobromin

- **Kofein (1,3,7 – trimethylxanthin)**

Kofein se také nachází v kakaových bobech. Jeho stimulační účinek je mnohem silnější, než mají ostatní methylxanthiny. Má pozitivní účinek na činnost mozkové kůry, povzbuzuje srdeční činnost, potlačuje ospalost, rozšiřuje cévy a zvyšuje krevní tlak. Také podporuje funkci ledvin, plic a uvolňování žaludečních kyselin. Jeho molekulová hmotnost je $194,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [5; 22; 23].

Tento alkaloid zvyšuje odbourávání glykogenu v játrech (tzv. glykolýzu) a také napomáhá štěpení tuků v tukových buňkách (tzv. lipolýze). Kofein je absorbován přes tenké střevo při procesu trávení. Mezi příznaky intoxikace kofeinem patří např. nevolnost, bušení srdce, nespavost nebo psychické podráždění [5; 22; 23].



Kofein

2.2.1.2 Minerální látky

Mezi důležité látky, které obsahují kakaové produkty, jsou vitamíny a minerální látky. Mezi nejvíce zastoupené patří železo 20 %, fosfor 30 %, hořčík 33 %, měď 25 %, draslík 27 % a vápník 13 %. Z vitamínů je to zejména tokoferol, který je obsažen v kakaovém másle [4; 12].

Draslík je jedním z minerálních prvků, který je obzvláště důležitý v buněčném metabolismu, zvláště při tvorbě makroergických fosfátů a v dějích probíhajících při excitaci svalových a nervových buněk. Doporučená denní spotřeba draslíku podle World Health Organization (WHO) je přibližně 90 mmol za den pro dospělé i pro děti. Při nedostatku draslíku bývá

poškozena funkce kosterního svalstva, ale také vnitřních orgánů. Především jsou pozorovány poruchy funkce střeva a funkční srdeční poruchy. Dalšími projevy hypokalémie jsou průjemy, zvracení nebo zvýšený krevní tlak. Hyperkalémie okolo $6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bývá dobře tolerována, závažnější je koncentrace $6,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a více, kdy je nutná hospitalizace a může dojít k selhání ledvin a poruchy srdečního rytmu. Tmavá čokoláda obsahuje 114 mg draslíku na 100 kcal, zatímco neslazený kakaový prášek obsahuje 82 mg na lžici a mléčná čokoláda obsahuje 67 mg [24; 25].

Hořčík v lidském těle příznivě ovlivňuje nervový a svalový systém, pozitivně ovlivňuje únavu a vyčerpání, ale také přispívá k zachování zdravých kostí a zubů. Dále snižuje riziko srdečního selhání. Pozitivně ovlivňuje imunitní systém. Jeho denní doporučený příjem je kolem 6 mg na kilogram pro dospělého člověka, nejčastěji se bere v potaz doporučení jednotlivých států a také hmotnost dané osoby. Mezi nejčastější projevy deficitu hořčíku patří neurologické stavy (bolesti hlavy, nervozita, deprese, porucha koncentrace), různé kardiologické příznaky (poruchy srdečního rytmu, tachykardie ad.), poruchy zažívacího traktu (křeče v břiše, žaludku a střevech) nebo svalové ochromení (povislé koutky úst, křeče a ztuhlost, mravenčení atp.) Tmavá čokoláda (70-80 % kaka) poskytuje 36 mg hořčíku na 100 kcal na porci [25; 26].

Měď je kofaktorem řady enzymů a je vyžadována pro metabolické procesy, včetně transportu železa či metabolismu glukózy. Nedostatek mědi může vést k anémii. Nedostatek mědi je spojen s intolerancí glukózy nebo srdeční arytmií. Vysoká koncentrace mědi v séru je spojena se zvýšeným rizikem úmrtí z různých příčin. Doporučené denní příjem je 2-5 mg. Výskyt mědi v čokoládě bývá více jak $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [25; 27].

2.3 Technologie zpracování kakaových bobů a jejich využití v potravinářství

Následující kroky zahrnují název „kakaové boby“.

Schéma technologického procesu výroby kakaového prášku a čokolády je znázorněno na obrázku 4. Následující kroky sklizeň, fermentační procesy a sušení zahrnují ve schématu název „kakaové boby“.

2.3.1 Sklizeň

Kakaové boby se sklízí v době, kdy se bobule lusků zabarvují a vydávají charakteristický chrastivý zvuk při poklepání. Lusky se sbírají ručně stejně tak, jako se i ručně otevírají pomocí mačety. Je důležité, aby se strom nepoškodil. Jednak kvůli napadení chorobami a škůdci, jednak aby nedošlo k poškození kauliflorie, protože z nich dále rostou květy (a plody) [3; 28].

2.3.2 Fermentační procesy

Po sklizni probíhá fermentace. Boby se opatrně rozlousknou, aby nedošlo k poškození bobů. Obsah lusků se vydlabá i s dužninou a umístí se do dřevěných kádí s otvory vystlanými banánovými listy nebo se fermentují na lískách [3; 28].

Teplota v první fázi fermentace by neměla překročit 38°C . Při této teplotě semena klíčí, ale zárodek nesmí prorazit osemením. Tato fáze trvá 1-3,5 dne v závislosti na podmínkách. Pak je nutné zvýšit teplotu na téměř 50°C , aby došlo k biochemickým procesům a vzniku látek, které vytvářejí chuť a vůni kaka [3; 6].

Délka fermentace závisí na metodě, druhu kakaovníku a množství fermentovaných semen. Uvádí se, že v bednách přikrytých listím se boby promíchávají každé dva dny a končí nejpozději šestým dnem. Na lískách je tento proces kratší. Trvá přibližně tři dny a semena se

nepromíchávají. Boby druhů kakaovníku criollo fermentují obvykle asi 24-28 hodin, trinitario 3-4 dny a forastero až 6 dnů [3; 4; 5].

Při fermentaci probíhají dva biochemické procesy – vnější a vnitřní. Při vnějším vlivem kvasinek *Saccharomyces* za přístupu kyslíku kvasí mšček a vzniká ethanol a oxid uhličitý. Na vznikající ethanol dále působí bakterie octového kvašení *Acetobacter*, které zkvašují alkohol na ocet. Vyšší teplota, která je způsobená biochemickými pochody, a kyselina octová rozruší mšček tak, až je snadno oddělitelný od semen [3; 28].

Vnitřní pochody probíhají již bez přístupu kyslíku. V této fázi se mění barva dělohy a uvolňuje se osemení. Dále dochází k vytvoření organoleptických látek, zejména aromatických a chuťových. Původní hořkokyselá chuť bobů se zjemňuje a díky esteru kakaolu vzniká typické kakaové aroma. Další složkou je kakaonin, který se štěpí na theobromin, glukózu a třísloviny, které se rozkládají na kakaovou červeň. Špatně fermentované boby obsahují větší množství tříslovin, které mají svíravou chuť a chybí jim typická kakaová vůně. Správně fermentovaná semena jsou základem kvalitních surovin v dalším zpracování. Boby druhu criollo mají žlutohnědou barvu, forastero červeněhnědou až purpurovou. Na druhé straně přefermentovaná semena mají kyselou chuť a jejich barva je nafialovělá až černá [3; 6; 29].

2.3.3 Sušení

Fermentované boby se mohou sušit přirozeně nebo uměle. Přirozené sušení využívá slunce a větru a závisí na intenzitě slunečního záření. Trvá až jeden týden. Nevýhodou je možnost kontaminace z okolního prostředí. Boby jsou rozprostřeny pod širým nebem ve vrstvě silné 5-10 cm a je nutné je neustále obracet a přebírat. Naopak umělé sušení je dražší způsob, ale můžeme regulovat teplotu. Boby jsou sušeny v sušárnách nebo bubnových sušičkách a sušení trvá asi 36 hodin [3; 6].

Při sušení klesá vlhkost semen. Usušené boby jsou na lomu křehké a hnědé s typickou kakaovou vůní. Pak probíhá kontrola kvality většinou ještě v zemích původu a prověřuje se kvalita, tvar, barva, velikost bobů, aroma a kvalita fermentace. Boby jsou plněny do jutových pytlů nebo lodních kontejnerů a jsou přepraveny do celého světa [3; 6].

2.3.4 Další kroky zpracování

Usušené kakaové boby je nutné očistit a přebrat, nečistoty odstranit. Po vyčištění se třídí na třídícím pásu. Boby dále postupují do předpražícího zařízení. Předpražení je typicky používané u velkých výrobců, protože tímto krokem dochází k menšímu úniku kakaového másla do slupek a drť je zároveň upražená rovnoměrněji [3; 29; 30].

Předpražené boby jsou drceny na drtícím stroji, slupky a klíčky jsou odstraněny proudem vzduchu. Takto vzniklá odklíčkováná a odslupkováná drť se mele na kakaovou hmotu, která je dále zpracovávána na čokoládovou hmotu nebo na výrobu kakaového prášku a kakaového másla. Proces může být zjednodušen přímým pražením kakaových bobů po dobu 14-20 minut při teplotě 80-130 °C pomocí kontinuálních bubnových pražiček a pak jsou drceny a tříděny [3; 29; 30].

2.3.4.1 Výroba čokoládové hmoty

Kakaová hmota se smíchá s cukrem, kakaovým máslem, případně dalšími surovinami v míchacím zařízení. Takto smíchané suroviny tvoří tzv. čokoládovou hmotu, která konzistencí připomíná cihlářskou hlínu. Zjemňování se provádí na válcovacích chlazených stolicích.

Čokoládová hmota odchází z válců ve formě sypkých vloček. Tyto vločky jsou dále zpracovány postupem tzv. konšování, který slouží ke zjemnění čokolády a sestává z kroků zahřívání v konšovacím stroji na 50-65 °C po dobu až 72 hodin. Zvyšuje se homogenita čokoládové hmoty, čímž se zlepšují chuťové vlastnosti a kvalita. Následně se hmota přesouvá do temperovacích strojů, kde dochází k získání teploty vhodné k dalšímu zpracování. V dělicích strojích se vytvářejí stejné dávky, které se plní do forem a míří do chladících skříní. Ztuhlé výrobky se vyklepávají z forem a balí se v balících strojích a připravují se k expedici [3; 6; 29; 30].

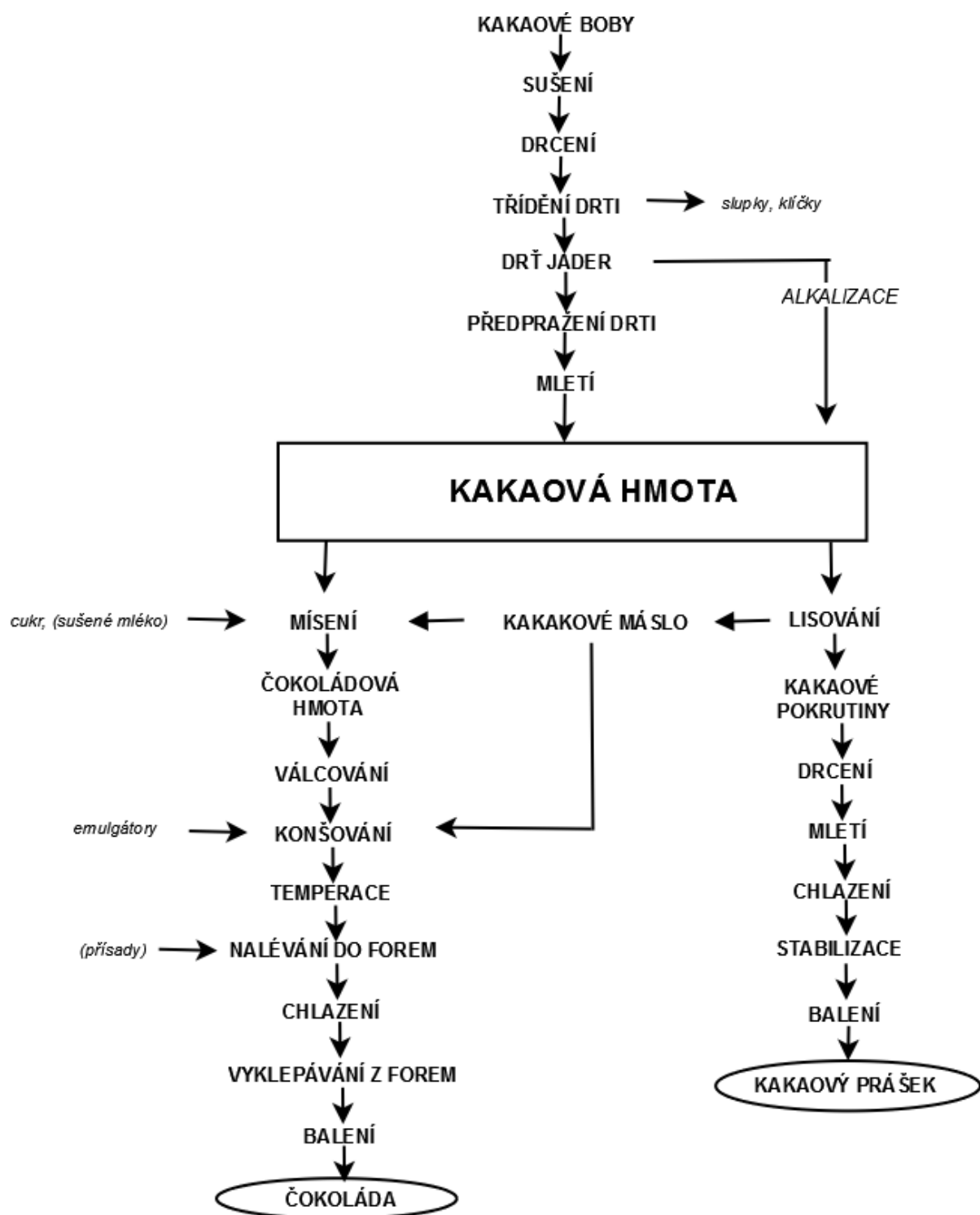
2.3.4.2 Výroba kakaového prášku a kakaového másla

Základem výroby kakaového prášku a kakaového másla je výroba kakaové hmoty. Jedním z významných kroků je alkalizace kakaového prášku působením zásaditého roztoku na kakaovou drť, která se potom mele. Postup alkalizace se nazývá jako „holandský“ a používá se uhličitán draselný, sodný nebo amonný. Barevné látky a třísloviny reagují s alkalickou látkou a dochází k široké škále barevných odstínů. Alkalizací se zlepšuje smáčivost a rozpustnost kakaového prášku. Kakaová hmota se před samotným lisováním vyhřívá na teplotu 70-80 °C, aby se zajistilo co největší množství vylisovaného másla, protože se vzrůstající teplotou klesá jeho viskozita [3; 29; 30].

Získaná hmota se lisuje na speciálních hydraulických lisech za tlaku kolem 30 MPa. Vylisovaný tuk (kakaové máslo) se využívá při výrobě čokoládových cukrovinek, v kosmetice ale také ve farmacii [3; 29; 30].

Odfiltrované kakaové máslo se jímá do nerezových nádrží, kde tuhne na pevné bloky. Po uvolnění lisu vypadají ze stroje vylisované kotouče pokrutin. Kotouče jsou drceny v drticích strojích na malé kousky. Tyto kousky postupují na výkonné mlýny, odkud jsou chlazeným vzduchem unášeny ve formě kakaového prášku do cyklonu. V něm se odděluje prášek od vzduchu, který prochází filtrem a je očištěn od jemných částic. Následně je vrácen zpět do uzavřeného oběhu. Krok výroby kakaového prášku je doplněn procesem ve stabilizátoru, aby došlo k dokonalému vykrystalizování kakaového másla do stabilní krystalické formy. Stabilizátorem je myšlena válcovitá nádrž, ve které je fludiní kakaový prášek províván chlazeným vzduchem. Takto stabilizovaný prášek je balen a expedován [29; 30].

Z hlediska legislativy podle vyhlášky č. 76/2003 Sb. rozlišujeme dva druhy kakaové prášku podle obsahu kakaového másla v sušině na: kakaový prášek (kakao) s obsahem kakaového másla nejméně 20 % a kakaový prášek se sníženým obsahem tuku s množstvím tuku méně jak 20 %.



Obrázek 4 Schéma technologického procesu výroby kakaového prášku a čokolád (převzato a upraveno podle [28])

2.4 Legislativní požadavky

Pro lepší orientaci jsou zde popsány některé pojmy, které jsou uvedeny ve vyhlášce č. 76/2003 Sb. Tato vyhláška stanovuje požadavky na přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Vyhláška vychází ze směrnice 2000/36/ES Evropského parlamentu a Rady z 23. června 2000 o kakaových a čokoládových výrobcích určených k lidské spotřebě.

Z oddílu 4 pro kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem § 15 se pro účely této vyhlášky rozumí:

- kakaovými boby – fermentovaná a sušená semena kakaovníku (*Theobroma cacao*)
- kakaovým tukem – tuk získaný z kakaových bobů nebo jejich částí nevyhovující požadavkům stanoveným pro kakaové máslo
- kakaovým máslem – tuk získaný z kakaových bobů nebo jejich částí odpovídající požadavkům uvedených v tabulce 3

Tabulka 3 Příloha č. 7 tabulky 3 ve vyhlášce

	Podíl látek nezmýdelnitelných petroletherem (% hmot. nejvýše)	Obsah volných mastných kyselin vyjádřených jako kyselina olejová (% hmot. nejvýše)
lisované kakaové máslo	0,35	1,75
kakaové máslo	0,50	1,75

- kakaovým práškem (kakaem) – potravina získaná z pražených kakaových bobů zbavených slupek, upravených do formy prášku, obsahující nejméně 20 % kakaového másla v sušině a nejvýše 9 % vody
- směsí kakaa s cukrem – potravina získaná mechanickým smísením nebo instantizací kakaa s cukrem v určitém poměru
- čokoládou v prášku – potravina vyrobená ze směsi kakaa a cukrů obsahující nejméně 32 % kakaa
- čokoládou k přípravě nápoje, slazeným kakaem, slazeným kakaovým práškem – potraviny vyrobené ze směsi kakaa a cukrů obsahující nejméně 25 % kakaa.

Nařízení Komise (EU) č. 488/2014 ze dne 12. května 2014, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kadmia v kakaových a čokoládových výrobcích s platností od 1. ledna 2019 stanovuje na limit $0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro kakaový prášek prodávaný konečnému spotřebiteli nebo jako složka slazeného kakaového prášku prodávaného konečnému spotřebiteli (čokoláda k přípravě nápoje).

Dále Nařízení Komise (EU) č. 420/2011 ze dne 29. dubna 2011, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, je limit pro stanovení olova $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Podle WHO je horní tolerovaný limit spotřeby mědi 10 mg na den pro ženy a do 12 mg na den u mužů.

2.5 Použité analytické metody

V této kapitole jsou teoreticky popsány metody, které byly využity při analýze reálných vzorků pro zpracování diplomové práce.

2.5.1 Stanovení obsahu vody

Stanovení vody patří mezi nejčastěji sledované ukazatele při kontrole potravin. Údaje o obsahu vody slouží pro určení jakosti a údržnosti potravin. Ke stanovení se využívají fyzikální, fyzikálně-chemické a chemické metody. Požadavky na časovou náročnost, přesnost a použitelnost jednotlivých metod jsou rozdílné a závisí na druhu zkoumaného materiálu, přístrojového vybavení laboratoře, času stanovení analýzy a požadované přesnosti. Metody stanovení vody dělíme a přímé a nepřímé. Přímé metody stanovení vody jsou nepřímé metody stanovení sušiny a naopak. Tento fakt vyplývá z definice sušiny, tj. sumy složek potravin kromě vody. Mezi přímé metody patří např. destilační metody, chemické metody, spektrální metody nebo elektrometrické metody. Nepřímé metody zahrnují různé techniky sušení v sušárnách až po sušení pomocí infralamp [29; 30; 31].

2.5.2 Vázkové stanovení popela (minerálních látek)

Pojmem minerální látka nebo též popeloviny (či popel) se označují prvky anebo sloučeniny vznikající mineralizací potravin. Minerální látky jsou významné jako složky výživy mikroorganismů, zvířat ale i člověka. Účastní se mnoha biochemických reakcí v organismu, zejména regulačních, oxidačně-redukčních, skeletotvorných a jsou také součástí enzymů. Některé z nich mohou mít i nežádoucí vliv na organismus, pak tyto látky označujeme jako toxické prvky [29; 30].

Minerální látky dělíme podle množství na majoritní minerální prvky (též označované jako makroelementy nebo oligobiogenní prvky). Patří sem zvláště Na, K, Ca, Mg, P, Cl, S aj. Jejich výskyt v potravinách je ve větším množství, tzn. v řádu stovek až desetitisících mg/kg. Dále do tohoto rozdělení patří tzv. minoritní minerální látky, které jsou zastoupeny v menším množství a představují několik desítek až stovek mg/kg. Obvykle tvoří přechod mezi majoritními a stopovými prvky a patří sem především Fe a Zn. Poslední skupinou jsou tzv. stopové prvky (také označované jako mikroelementy) a bývají zastoupeny v malých koncentracích od desítek mg/kg a méně. Patří sem Al, As, B, Cd, Co, Cr, Cu, F, (Fe), Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, (Zn) [30; 31].

Další rozdělení minerálních látek je podle fyziologické funkce na esenciální prvky (prvky nezbytné pro organismus), které musí být přijímány v určité koncentraci, aby byla zajištěna biologická funkce organismu. Mezi tyto prvky patří všechny majoritní prvky a skupina stopových prvků. Pak do rozdělení řadíme toxické prvky, které ve své elementární formě nebo ve formě sloučenin vykazují toxické vlastnosti, mezi které patří inhibice metabolicky významných enzymů. Zejména sem řadíme prvky Pb, Cd, Hg a As. Mezi poslední skupinu prvků, které rozlišujeme patří prvky neesenciální, u kterých není dosud známa biologická funkce, nejsou výrazně toxické nebo jsou fyziologicky indiferentní. Do této skupiny patří chemické prvky zastoupené ve stopových množstvích a často také doprovázejí prvky esenciální [31].

Obsah popela je považován za jeden z ukazatelů kvality potravin. Popelem rozumíme podíl látky nespálitelný při předepsané teplotě. Stanovení obsahu popela se provádí opatrným

zuhelnatěním a vyžiháním vzorku ve spalovací misce, která je předem vyžihána a zvážena. Metoda je použitelná pro všechny druhy potravinářských substancí [31].

2.5.3 Stanovení alkality popela

Dalším z ukazatelů kvality potravin je stanovení alkality popela. Alkalita popela se nejčastěji stanovuje po mineralizaci suchou cestou (zpopelněním vzorku), kdy se popel nechá zreagovat s nadbytkem roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl) o známé koncentraci. Přebytek kyseliny se stanoví titrací hydroxidem sodným (NaOH) o stejné koncentraci na indikátor fenolftalein [30; 31]. Alkalita popela A_p se vypočítá jako počet mililitrů HCl o jednotkové koncentraci (tedy o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), které jsou potřeba k neutralizaci popela o hmotnosti 1 g [32].

2.5.4 Stanovení celkového obsahu lipidů

Lipidy jsou definovány jako přírodní sloučeniny, které obsahují esterově vázané mastné kyseliny o více než třech atomech uhlíku v molekule. Lipidy tvoří skupinu lipofilních chemicky rozdílných sloučenin. Jsou sem zahrnuty acylglyceroly, volné mastné kyseliny, vosky, steroidy, složené lipidy, doprovodné nepolární látky aj. Podle chemického složení můžeme lipidy rozdělit do tří skupin na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy. Dalším rozdělení lipidů je podle chování v chromatografickém systému na neutrální a polární lipidy. V analýze lipidů se využívá celá řada metod, které se dělí podle stanovení jednotlivých parametrů, jako je stanovení celkového tuku, tukových charakteristik a stanovení jednotlivých složek tuku [29; 30; 31].

Stanovení celkového obsahu lipidů zahrnuje počet všech látek, které jsou extrahovatelné daným rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel za podmínek dané metody. V této diplomové práci byla použita metoda podle Soxhleta, která je vhodná pro analýzu olejnin a jim podobných materiálů bohatých na neutrální lipidy s nízkým obsahem vody. K tomu byl využit přístroj Soxtherm, který provádí automatickou extrakci a celý proces je programovatelný v jednotlivých krocích. Lipidy se vyextrahují ze vzorku nepolárním rozpouštědlem, po oddestilování rozpouštědla a vysušení se tuk odváží [30; 31; 32].

Stanovení obsahu tukuprosté kakaové sušiny

Specifikace metody pro stanovení tukuprosté kakaové sušiny v čokoládě, čokoládových cukrovinkách, kaka a směsi kaka s cukrem uvádí norma ČSN 56 0578. Stanovení se provádí pomocí kapalinové chromatografie v systému reverzní fáze a vypočte se ze sumy obsahů theobrominu a kofeinu vynásobený faktorem, který je odvozen z průměrného obsahu těchto látek v tukuprosté kakaové sušině.

2.5.5 Stanovení celkového dusíku

Jedním z důležitých ukazatelů kvality potravin je stanovení celkového obsahu dusíku. Pro stanovení se využívá Kjeldahlova metoda. Vzorek se zmineralizuje varem v koncentrované kyselině sírové za přídavku katalyzátoru. Dusíkaté látky se převedou na síran amonný, z něhož se v alkalickém prostředí uvolní amoniak, předestiluje se vodní párou a stanoví se titračně. Tato metoda má univerzální použití, není-li obsah dusíku příliš nízký [30; 32].

2.5.6 Popis instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří do skupiny separačních technik, konkrétně do chromatografických metod. HPLC je nejčastějším uspořádáním kapalinové

chromatografie, kdy je mobilní fáze do systému přiváděna díky čerpadlu za vysokého tlaku. Hlavním principem chromatografických metod je odlišné rozdělování směsi látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé). Jak již bylo zmíněno HPLC patří do druhu kapalinové chromatografie, kdy mobilní fází je kapalina. Stacionární fáze se rozděluje podle použitého separačního mechanismu na adsorpční, rozdělovací, gelovou permeační, iontovou, afinitní nebo HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí). Podle geometrie systému rozlišujeme papírovou chromatografii, tenkovrstvou chromatografii nebo sloupcovou [33].

2.5.6.1 Princip metody a retenční charakteristiky

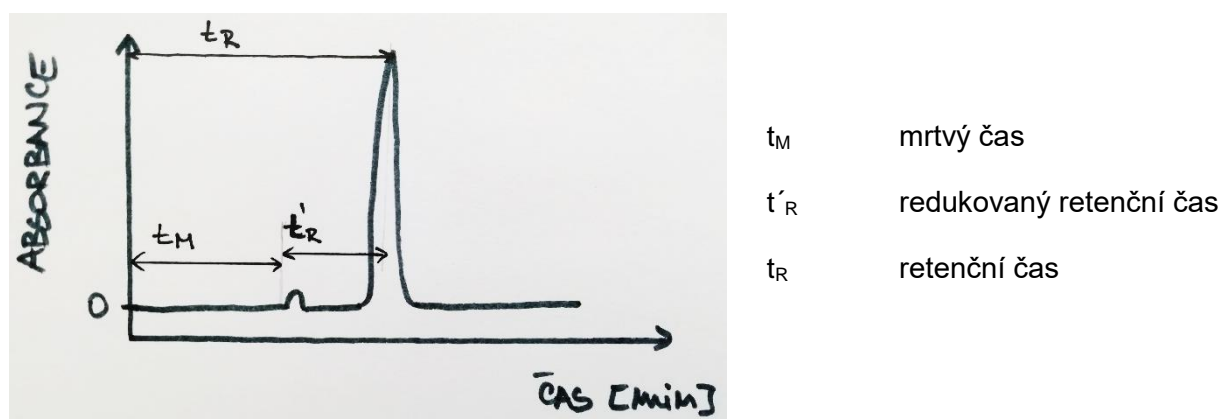
HPLC vyniká svou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fázi [33; 34].

Vysokou účinností kapalinový chromatograf pracuje tak, že jsou vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku [34].

K základní teorii chromatografie patří časové retenční charakteristiky uvedené na obrázku 5. Veličina, označená jako t_R , se nazývá retenční čas a je to celkový čas od nástřiku vzorku do zaznamenání maxima píku. Vypočítá se pomocí vztahu (28):

$$t_R = t_M + t'_R \quad (1)$$

kde t_R je retenční čas, t_M je mrtvý čas a t'_R je redukovaný retenční čas. Mrtvý čas je čas, který separované látky stráví v mobilní fázi. Také se označuje jako mrtvý čas kolony. Redukovaný retenční čas je čas, jaký separované složky tráví ve fázi stacionární [33; 34].



Obrázek 5 Retenční charakteristiky v chromatogramu [34]

Kvalitativní analýza se pomocí HPLC provede vyhodnocením retenčních časů analytů a následně porovnáním těchto hodnot s retenčními časy standardů. Kvalitativní analýza je

stanovena výpočtem plochy píku analytu a porovnáním plochy nebo výšky píku standardu o známé koncentraci [34].

Další veličinou, která udává retenční charakteristiku, patří lineární rychlost mobilní fáze, což je rychlost, kterou se molekuly separovaných látek pohybují kolonou. Její hodnota se dá vypočítat ze vzorce:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \quad (2)$$

kde t_M je popsáno ve vztahu (28) a L představuje délku kolony. Jednotky se udávají v $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ [33].

Kvalita kolony se posuzuje z tzv. počtu teoretických pater. Jedná se o parametr snadno zjistitelný z chromatogramu a říká nám, jakým způsobem daná kolona dělí. Blíží-li se počet teoretických pater nekonečnu, respektive velkému číslu, pak píky mají Gaussovský tvar. Teoretické patro jako takové neexistuje, je to veličina, která slouží k porovnání dvou chromatografických kolon. Počet teoretických pater se vypočítá jako:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3)$$

kde t_R je retenční čas, w je šířka píku v základně a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky [33].

Výškový ekvivalent teoretického patra podává informaci o kvalitě kolony a jeho velikost je úměrná průměru částic náplně. Lze ho vypočítat jako podíl celkové délky kolony ku celkovému počtu teoretických pater [33]:

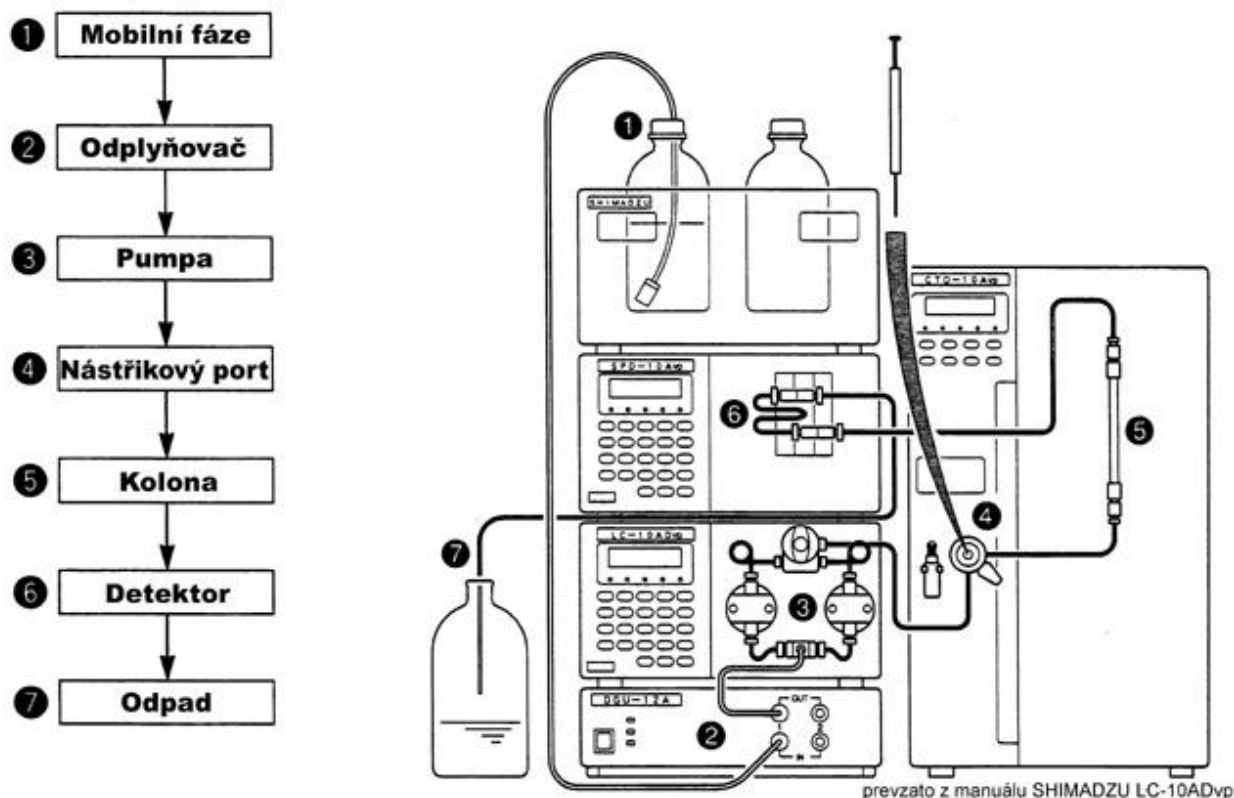
$$H = \frac{L}{n} \quad (4)$$

2.5.6.2 Popis chromatografu

Vysokého účinku procesu se dosahuje s využitím vysokého hydrodynamického tlaku. Vytvořením přetlaku sahajícího od jednotek až po desítky MPa dosáhneme dostatečného průtoku mobilní fáze [34].

HPLC chromatograf je zobrazen na obrázku 6 a skládá se ze: zásobní lahve mobilní fáze, odplyňovače mobilní fáze, vysokotlaké pumpy, dávkovacího zařízení, termostatu, kolony se stacionární fází, detektoru a lahve na odpad. Mobilní fáze je přiváděna inertními hadičkami ze zásobních lahví přes odplyňovací zařízení do vysokotlaké pumpy, dále pak přes dávkovací zařízení, kde se nastříkovaný vzorek míchá s mobilní fází, ta jej dále unáší kolonou uloženou v termostatu. Na koloně probíhá separace na základě slabých nevazebných interakcí. Takto rozdělené analyty dále postupují kolonou s rozdílnými retenčními časy do detektoru. Na základě odezvy detektoru je výsledný signál zpracován počítačem [34].

Blokové schéma HPLC



Obrázek 6 Schéma HPLC (převzato z manuálu SHIMADZU Lc-10ADvp)

V dnešní době se využívají dva systémy fází. Prvním z nich je systém s normálními fázemi, kdy stacionární fáze je tvořena čistým silikagelem nebo polární chemicky vázanou fází na silikagelovém nosiči. Mobilní fázi tvoří nepolární rozpouštědla např. pentan, hexan, toluen nebo benzen. Retence látek je určena slabými mezimolekulárními interakcemi látky s mobilní fází. Retence látek se zvyšuje s rostoucí polaritou analytu [33; 34].

Druhý je systém na reverzních fázích. Tento systém se využívá nejvíce. Náplň kolon bývá silikagel s navázanými nepolárními fázemi (př. C8, C18). Mobilní fáze je polární, nejčastěji směs vody a polárních rozpouštědel (methanol, acetonitril), případně s přidavkem pufrů, solí nebo kyselin. Tímto způsobem se separují polární sloučeniny, mezi něž řadíme vitaminy, organické kyseliny, anthokyany, cukry či fenolové sloučeniny [33; 34].

Dalšími méně využívanými HPLC systémy je např. iontově výměnná chromatografie, iontopárová chromatografie, micelární chromatografie nebo hydrofobní interakční chromatografie, ad. [33; 34].

Zásobníky mobilní fáze (MF)

Zásobníky mobilní fáze se většinou skládají z jedné až čtyř kusů lahví o objemu 1 l nebo 2,5 l, kde je uchována mobilní fáze a kde dochází k jejímu odplynění pomocí vakuového odplyňovače. Plyny tvoří v kapalině nežádoucí bublinky a kyslík zhasí fluorescenci [33; 35].

Čerpací zařízení

Pomocí čerpadla se čerpá kapalina do kolony. Jendou z požadovaných vlastností každého čerpadla je stabilní průtok mobilní fáze. Čerpadla můžeme rozdělit do dvou kategorií podle funkce při konstantním tlaku nebo při konstantním objemovém průtoku. Oba tyto typy pracují na principu vytlačování mobilní fáze ze zásobníku membránou nebo pístem. Rozdíl je ve způsobu dosažení pohybu pístu čerpadla. Čerpadla pracující při konstantním tlaku využívají tlak plynu nebo hydraulické kapaliny na píst čerpadla. U čerpadel s konstantním objemovým průtokem je využíván mechanický pohon k pohybu pístu [33; 35].

Dávkovací zařízení

Dávkování vzorku na chromatografickou kolonu je také jedním z ukazatelů účinnosti kolony. Při defektním dávkování může docházet k rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. Dávkování injekční stříkačkou má své nevýhody v těsnosti, udržení tlaku a kontaminaci materiálu injekční stříkačky. V současné době jsou spíše využívány manuální smyčkové dávkovače, které fungují na principu přepínacích ventilů, nebo automatické dávkovače (autosamplery) různých konstrukcí [33; 35].

Chromatografické kolony

Kolony jsou trubice z nerezové oceli tvořené náplněmi o různé zrnitosti (velikosti částic), rozměrech a tvaru, které bývají termostatovány. Chromatografické kolony musí odolávat vysokým tlakům (až do 100 MPa), vnitřní povrch by měl být dokonale hladký a musí odolávat chemickému působení mobilní fáze. Dnes se pro analytické účely používají kolony o vnitřním průměru 2,1-5,0 mm, délce 10-300 mm a náplněmi o velikosti částic 1-10 μm . Distribuce mobilní fáze a analytu by měla být dosažena rovnoměrně přes celý průřez kolony dosažená v co nejmenším objemu a s minimálními mimokolonovými příspěvky, protože způsob distribuce mobilní fáze i analytu ovlivňuje rozlišení, ale i účinnost zejména u krátkých kolon o velkém vnitřním průměru [33; 35].

Detektory

Detekční systémy bývají v chromatografickém systému HPLC umístěny za chromatografickou kolonou. Jejich funkce je zaznamenávat rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Detektory můžeme rozdělit na koncentrační a hmotnostní nebo na destruktivní a nedestruktivní. Mezi některé vlastnosti, které by měl detektor splňovat, patří: citlivost, dostatečná odezva, specifita, linearita, spolehlivost ad. V dnešní době převažuje využití hmotnostní spektrometrie jako detekční techniky. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční. [33; 35].

Záznamové zařízení

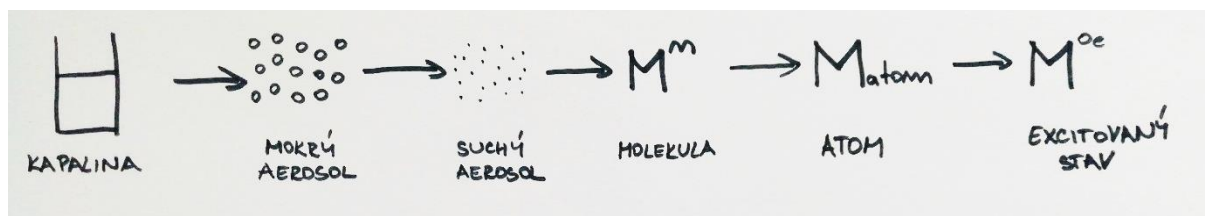
Pro sběr a vyhodnocení dat slouží v současné době osobní počítač a příslušný software [33; 35].

2.5.7 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP–OES)

ICP-OES je analytická metoda, která je citlivá a dostatečně selektivní pro stanovení většiny prvků. Je založena na sledování emise elektromagnetického záření volnými atomy látek v plynném stavu. Atomové emisní spektrum vzniká přechodem elektronů z vyšší energetické hladiny na nižší, přičemž se tento jev řídí pravidly selektivity z oboru kvantové mechaniky [36; 37].

Principem této techniky je to, že atomová emise měří energii, kterou elektron vyzáří v excitovaném stavu při návratu do energeticky chudšího stavu. Tato energie se uvolňuje ve formě světelného záření o vlnové délce λ , respektive ve formě fotonu o frekvenci přenášející energii $h \cdot \nu$ [36; 37].

Atomové spektrum je tvořeno oddělenými, nespojitými spektrálními čarami. Počet emitovaných fotonů je přímo úměrný počtu excitovaných atomů sledovaného prvku za stálých podmínek. Aby mohlo dojít k excitaci, musí být vzorek atomizován, tedy disociován na atomy, případně ionizován na volné ionty. Jednotlivé kroky průběhu atomizace jsou vyobrazeny na obrázku 5 [36].



Obrázek 7 Jednotlivé kroky atomizace (převzato a upraveno podle [36])

Podle druhu částice, která je excitována, rozlišujeme spektrální čáry:

- atomová emise: čára I
- emise jednou ionizovaného iontu: čára II
- emise dvakrát ionizovaného iontu: čára III

V indukčně vázaném plazmatu se nacházejí převážně čáry I a II, vzácně III. Ovšem se zde nevyskytují čáry vyšších stupňů ionizace, což je způsobeno množstvím dodávané energie – limitované ionizačním potenciálem nosného plynu argonu $E_i = 15,8$ eV [36].

Všechny tyto jevy se odehrávají v plazmatu. Plazmou bývá elektricky neutrální a více či méně ionizovaný plyn. Nejvíce používaným nosným plynem v ICP-OES je argon (Ar) [36].

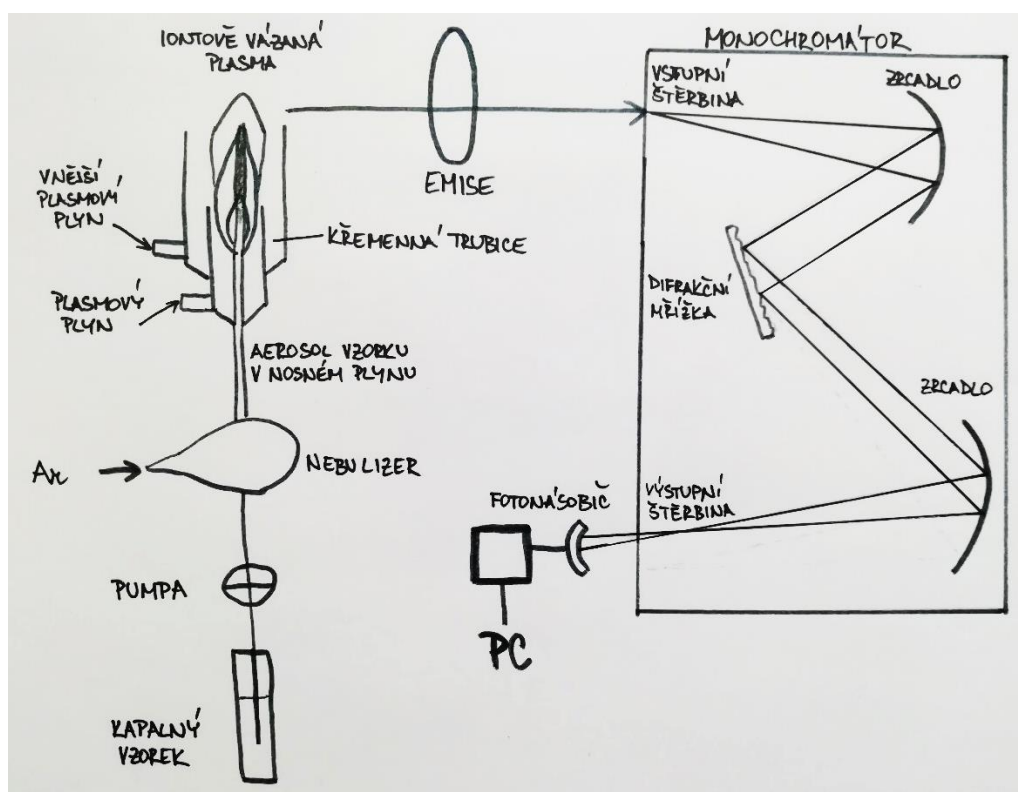
Tvorba plazmatu vzniká tak, že tok argonu přichází křemennou trubicí dovnitř solenoidu. Elektromagnetické siločáry, vytvořené magnetickým polem, směřují od osy solenoidu k vnitřku trubice a vytváří tak vnitřní elipsy. Pomocný vysokofrekvenční výboj z Teslova transformátoru ionizuje argon uvnitř plazmové hlavice, čímž vytváří vodivé dráhy pro vazbu radiofrekvenčního indukčně vázaného plazmatu. Uvolněné elektrony vlivem indukovaného magnetického pole krouží podle osy křemenné trubice po kružnicích a vytváří se tak indukované Foucaultovy vířivé proudy. Elektrony jsou na své dráze brzděny kolizemi. Vytváří se tedy teplo k disociaci molekul plynu, současně dochází k ionizaci dalších atomů plynu, díky čemuž se plasma samo udržuje [36; 37].

2.5.7.1 Popis ICP–OES spektrometru

Spektrometr se skládá z pěti částí [36; 37]:

1. Systém zavádění vzorku mířeného do plazmatu
2. Radiofrekvenční (RF) generátor dodávající plasmě energii
3. Optický systém separující vlnové délky
4. Systém detekce a zpracování signálu, který umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu na základě emitovaného záření
5. Programové rozhraní umožňující uživateli komunikovat s přístrojem

Vzorky zaváděné do plazmatu mají povahu kapalných roztoků nebo jsou tvořeny jemnými částicemi suspendovanými v roztoku.



Obrázek 8 Schéma ICP-OES spektrometru (převzato a upraveno podle [38; 35])

2.5.7.2 Systém zavádění vzorku

Systém zavádění vzorku je tvořen zmlžovačem, mlžnou komorou, směšovačem stínícího plynu a injektorem.

Zmlžovač vytváří aerosol, jenž má polydisperzní distribuci částic (od několika jednotek μm po stovky μm). Kapky větší jak $10\ \mu\text{m}$ jsou odseparovány v mlžné komoře. Mlžná komora separuje kapky v aerosolu podle velikosti. Z mlžné komory je aerosol zaveden přes směšovač se stínícím plynem do injektoru plazmové hlavice a pomocí něj do plazmy. Hlavice, která je zcela demontovatelná, je tvořena třemi koncentrickými trubicemi:

1. vnější křemenná trubice
2. vnitřní skleněná trubice
3. korundový injektor ve středu.

Vnější kanálem se pak zavádí tangenciálně vnější plasmový plyn. Prostředním kanálem se přivádí vnitřní plasmový plyn (= přídavný plyn), který umožňuje nadzdvihnout základnu plasmy nad vnitřní trubici (toto se využívá pro stanovení organických roztoků). Centrálním kanálem prochází vzorek ve formě aerosolu unášeného argonem, který je tvořen směsí nosného a stínícího plynu [36; 37].

2.5.7.3 Generátor vysokofrekvenčního proudu

Funkce generátoru je dodávání energie, která je potřebná k udržování plazmatu. Generátor je tvořen třemi částmi [36]:

1. napájením, které dodává výkon
2. oscilátorem – transformuje tento výkon na radiofrekvenční energii o frekvenci 40,68 MHz
3. přizpůsobovacího zařízení, které přenáší energii do plazmatu.

2.5.7.4 Spektrometr

Spektrometr je tvořen dvěma částmi, a to osvětlovacím systémem a disperzním systémem. Osvětlovací systém přivádí světlo na vstup spektrometru, který je vyzařováno plazmatem. Tento systém obsahuje jednu nebo soustavu čoček, které zobrazují plazma na vstupní štěrbině spektrometru. Srdce spektrometru tvoří holografická mřížka, která je vyrobena na speciálním skleněném podkladu, který je pokryt fotocitlivou vrstvou s množstvím paralelních vrypů. Úkolem mřížky je difrakce světla, která stejně jako optický hranol rozkládá bílé nebo polychromatické světlo na světlo o různé vlnové délce. Monochromátor přístroje Horiba Ultima 2 je typu Czerny-Turner a je zkonstruován z [36]:

1. vstupní štěrbinu
2. kolimátorového zrcadla (tvoří divergující svazek paprsků vycházejícího ze štěrbinu svazek paralelní a směřující k holografické mřížce)
3. difrakční mřížky (produkuje paralelní, difrakcí monochromatizované paprsky)
4. kamerového zrcadla (přijímá monochromatizované paprsky a fokusuje je na výstupní štěrbinu)
5. výstupní štěrbinu (vybírání paprsky podle nastavené vlnové délky).

Vstupní i výstupní štěrbinu mají pevnou vzdálenost svých středů. Mřížka je rovinná a zrcadla jsou umístěna v ohniskové vzdálenosti od štěrbin. Natočením mřížky, případně změnou úhlu od normály je možné měřit svazky paprsků v celkovém rozmezí 120–800 nm. Difraktované světlo je pomocí fotonásobiče převedeno na měřitelný signál – elektrický proud, který je převeden na elektrické napětí na pulzy, které se potom sčítají [36].

V tabulce 4 je uvedeno srovnání s některými dalšími technikami pro stanovení prvkové analýzy [37].

Tabulka 4 Srovnání s některými metodami

Analytická metoda	Stanovované prvky	Detekční limity	Výhody	Nevýhody
ICP-MS = hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	většina kovů a nekovů	$\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$	citlivá metoda, široký dynamický rozsah, dobrá kontrola interferencí, krátká doba analýzy, s oblibou používaná metoda, výhody v MS analyzátoru	vysoké provozní a investiční náklady
ICP-OES = optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	většina kovů a některé nekovy	$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ - $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	jednoduchá, přesná metoda, vysoká TDS (= celkové rozpuštění pevné látky) tolerance, rychlá multiprvková metoda	složité interference, relativně malá citlivost
F-AAS = plamenová atomová spektrometrie	většina kovů a některé nekovy (až 68 prvků)	až $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	univerzální metoda, velmi dobrá opakovatelnost, žádné nebo jen mírně rušivé vlivy, snadná automatizace měření, nízké provozní náklady, rychlá analýza	potřebné velké množství vzorku k analýze, nutnost výměny lampy při přechodu na analýzu jiného vzorku

3 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat stručnou botanickou charakteristiku kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*), popsat biologicky aktivní látky v jeho plodech a zpracovat přehled technologie zpracování a využití kakaových bobů v potravinářství. Dále popsat instrumentální metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC, která byla využita ke stanovení theobrominu, kofeinu a sacharózy.

Praktická část diplomové práce zahrnovala tyto experimenty, respektive kroky:

1. Úpravu vzorků pro analýzy.
2. Analýzu reálného vzorku kakaového prášku.
3. Ověření metody stanovení theobrominu a kofeinu kapalinovou chromatografií.
4. Zpracování dat a jejich vyhodnocení.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

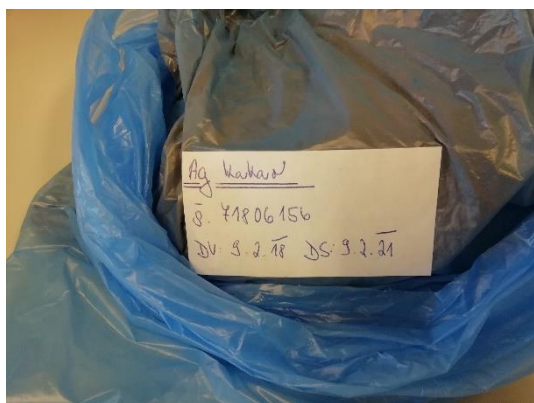
4.1 Materiál

4.1.1 Testované vzorky

Vzorek č. 1 byl darován firmou AG FOODS. Zbylé vzorky č. 2–4 byly zakoupeny v prodejně JEN ZDRAVĚ. Vzorky jsou uvedeny v tabulce 5 a byly uchovávány ve skříňce při laboratorní teplotě.

Tabulka 5 Analyzované vzorky

	Druh vzorku	Výrobce	Poznámky
1	Kakao	AG FOODS	šarže: 71806156
2	Kakaové boby pražené	František Bačík	původ: Ekvádor
3	Kakaová hmota	František Bačík	původ: Ekvádor
4	Čajová směs z kakaových bobů	František Bačík	původ: Ekvádor



Charakteristika:

AG CACAO Exclusive je 100% čisté kakao se sníženým obsahem tuku, bez přidaného cukru.

Obrázek 9 Vzorek č. 1 – kakao

Výživové údaje na 100 g:

Energetická hodnota 299 kcal, tuky 10,5 g, sacharidy 8,5 g, bílkoviny 23,5 g.



Charakteristika:

Kakaové boby jsou semena kakaovníku pravého. Jsou vhodné k přímé konzumaci např. jako oříšky – oloupané i neoloupané (se slupkou). Rozdrcené boby lze použít v kuchyni k přípravě pokrmů.

Pražení kakaové boby jsou křehčí než nepražené a mají výraznější chuť a vůni po čokoládě.

Obrázek 10 Vzorek č. 2 - kakaové boby pražené

Výživové údaje na 100 g:

Energetická hodnota 2 310 kJ (561 kcal), tuky 48,92 g, z toho: nasycené mastné kyseliny 29,15 g, sacharidy 1,2 g, z toho: cukry: 1,19 g, vláknina 30,4 g, bílkoviny 13,79 g, sůl 0,03 g.



Charakteristika:

100% kakaová hmota vzniká mletím nepražených kakaových bobů ve speciálních mlýnech, obsahuje cca 50–55 % kakaového másla. Pro výrobu čokolády je kakaová hmota základní surovinou. Lze ji využít k přímé konzumaci, kdy bývá označována jako tzv. „100% čokoláda“. Je vhodná k pečení a vaření.

Obrázek 11 Vzorek č. 3 - kakaová hmota

Výživové údaje na 100 g:

Energetická hodnota 2 410 kJ (586 kcal), tuky 52,41 g, z toho: nasycené mastné kyseliny 31,11 g, sacharidy 1,3 g, z toho: cukry: <0,4 g, vláknina 26,4 g, bílkoviny 14,16 g, sůl 0,064 g.



Charakteristika:

Směs z kakaových bobů – drcené kakaové boby a kakaové slupky. Na přípravu nápoje se použijí 2 polévkové lžíce „čajové směsi“, které se zalijí 0,5 l vařící vody a nechá se luhovat 10–15 minut, poté se scedí. Do takto připraveného nápoje je možné přidat koření jako je drcený hřebíček, skořice, vanilka nebo mléko.

Obrázek 12 Vzorek č. 4 - čajová směs z kakaových bobů

Výživové údaje na 100 g:

Energetická hodnota 2 310 kJ (561 kcal), tuky 48,92 g, z toho: nasycené mastné kyseliny 29,15 g, sacharidy 1,2 g, z toho: cukry: 1,19 g, vláknina 30,4 g, bílkoviny 19,79 g, sůl 0,03 g.

4.1.2 Koncentrační řady použitých kalibračních křivek

Pro sestrojení kalibrační křivky theobrominu, kofeinu a sacharózy pro metodu HPLC byly použity komerčně zakoupené látky od firmy Sigma-Aldrich. Kalibrační křivka theobrominu měla koncentrační řadu: 0; 0,1; 0,067 a 0,033 g·l⁻¹, kofeinu 0; 0,05; 0,031 a 0,015 g·l⁻¹ a sacharóza měla koncentraci 203,702 mg·l⁻¹.

Pro metodu ICP-OES byla kalibrační řada pro draslík: 0; 25; 50 a 100 mg·l⁻¹ a pro stanovení toxických prvků: 0; 0,5; 1 a 5 mg·l⁻¹.

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Automatická destilační jednotka Vapodest 200 (Gerhardt, SRN)
- Automatický extraktor Soxtherm SOX 402 MICRO (Gerhardt, SRN)
- Elektrická sušárna Memmert UFE 550 (Memmert, SRN)
- Elektrický vařič ETA 2117 (ETA, ČR)
- Elektrická pec
- HPLC Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, JPN)
- HPLC Agilent Infinity 1260 (Agilent technologies, USA)
- ICP-OES Horiba Ultima 2 (Horiba, JPN)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Lednička s mrazničkou (Liebherr, SRN)
- Mikrofiltry MCE Syringe Filters (póry: 0,45 µm, průměr: 13 mm) (Kromatek, UK)
- Mineralizační bloky KJELDATHERM KT s ručním zdvihem (Gerhardt, SRN)
- Přístroj na přípravu vody pro HPLC (Labicom, ČR)
- Rotační vakuová odparka IKA Werke RV06-ML (IKA Werke, SRN)
- Skleněný exsikátor
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek s. r. o., SK)
- Laboratorní sklo, plastový materiál a další laboratorní vybavení

4.1.4 Chemikálie

- Acetonitril (Sigma-Aldrich, FRA)
- Destilovaná voda
- Kofein (Sigma-Aldrich, CHN)
- Multiprvkový vodný kalibrační roztok v 5% HNO₃ CZ9089MN1 (100 mg·l⁻¹, ČMI, ČR)
- Petrolether (PENTA s.r.o., ČR)
- Sacharóza (Sigma-Aldrich, SRN)
- Standardní roztok K ve 2% HNO₃ Astasol AN902810N-100 (1000 mg·l⁻¹ Analytika s.r.o., ČR)
- Theobromin (Sigma-Aldrich, SRN)
- Ultra čistá destilovaná voda pro ICP a pro HPLC
- Běžné laboratorní chemikálie

4.1.5 Roztoky

- Zásobní roztok theobrominu (0,02 g theobrominu na 100 ml deionizované vody)
- Zásobní roztok kofeinu (0,1 g kofeinu na 100 ml deionizované vody)
- Zásobní roztok $((\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (0,6342 g $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na 100 ml vody)

4.2 Metody

Jednotlivé postupy byly prováděny na základě používaných skript [29; 30; 31; 32] s drobnými úpravami. Ve vzorcích byly stanovovány tyto parametry: voda, popel, alkalita popela, tuk, theobromin a kofein, tukuprostá kakaová sušina, sacharóza, celkový dusík, draslík a toxické prvky (Cd, Pb, Cu).

4.2.1 Nepřímé stanovení vody metodou sušení

- V této diplomové práci byla využita metoda tzv. nepřímého stanovení vody, tedy sušením, a to v sušárně. Tato metoda je obecně použitelná pro materiály neobsahující vysoké množství cukrů. Zhomogenizované vzorky, uvedené v tabulce 5, byly podrobeny vysušení v elektrické sušárně při teplotě $105 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 hodin.
- Nejdříve byl zvážena prázdný a suchý aluminový kelímek.
- Pak bylo naváženo 5 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na čtyři desetinná místa.
- Vzorky byly sušeny v elektrické sušárně při $105 \text{ }^\circ\text{C}$ nejdříve po dobu 4 hodin. Pak byly umístěny do exsikátoru, vychlazeny na laboratorní teplotu a zváženy. Následně byly vzorky umístěny do sušárny na 30 min a postup se opakoval po půlhodinových intervalech, dokud nebylo dosaženo celkového času sušení 5 h.
- Obsah vody byl stanoven ze vztahu pro hmotnost vzorku před a po odstranění vody takto [30; 32]:

$$\text{vlhkost (\%)} = 100 \cdot \frac{(m_{\text{FW}} - m_{\text{DW}})}{m_{\text{FW}}} \quad (5)$$

kde m_{FW} je hmotnost čerstvého vzorku a m_{DW} je hmotnost suchého vzorku [30].

4.2.2 Vázkové stanovení popela

- Do předem vyžíhaného a zváženo porcelánového kelímku byly naváženy přibližně 2 g vzorku s přesností na čtyři desetinná místa. Takto přichystané vzorky se nechaly opatrně zuhelnatět na vařiči v digestoři. Pak byly porcelánové kelímky umístěny do elektrické pece, kde se žíhaly při $600 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu přibližně 6 hodin. Po vyžhání byly kelímky umístěny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy.
- Hmotnost popela se vypočítala z rozdílu hmotnosti vzorku před žháním a po žháním a vyjádřila se v hmotnostních procentech w_p pomocí vzorce:

$$w_p = \frac{m_{\text{pv}}}{m_n} \quad (6)$$

kde m_{pv} je hmotnost vzorku po vysušení a m_n je hmotnost navážky [32].

4.2.3 Stanovení alkality popela

- Byla provedena standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného, kdy byla v prvním kroku vypočtena navážka dihydrátu kyseliny šťavelové potřebné pro přípravu 100 ml roztoku o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vypočtené množství bylo diferenčně odváženo s přesností na čtyři desetinná místa, kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Z tohoto roztoku bylo pipetování přesně 10 ml do titrační baňky, přidaly se tři kapky roztoku fenolftaleinu a titrovalo se odměrným roztokem hydroxidu sodného do prvního trvalého růžového zbarvení. Tato titrace byla provedena 3x a z průměrné spotřeby byla vypočtena přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného.
- Dalším krokem byla standardizace odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové, kdy do titrační baňky bylo napipetováno přesné množství 10 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Následně byly přidány tři kapky Tashirova indikátoru. Bylo titrováno standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu sodného do prvního trvalého žlutého zbarvení. Titrace byla provedena 3x a díky výsledkům průměrné spotřeby byla vypočtena koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové.
- Vlastní stanovení bylo provedeno tak, že se navážilo asi 0,06 g vzorku popela s přesností na čtyři desetinná místa. Navážka se kvantitativně převedla vroucí vodou do 100 ml Erlenmayerovy baňky, aby celkový objem byl 5 ml. Pak bylo přidáno několik kapek fenolftaleinu a titrovalo se odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové do odbarvení. Pak bylo přidáno ještě 10 ml kyseliny, obsah baňky se zahříval 15 minut na vroucí vodní lázni a přefiltroval do titrační baňky. Filtr byl promýván vroucí vodou do vymizení kyselé reakce. Po ochlazení se nezreagovaný přebytek kyseliny zpětně titroval odměrným roztokem hydroxidu sodného do růžového zbarvení.
- Výpočet teoretické navážky dihydrátu kyseliny šťavelové $((\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ pro přípravu roztoku o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ potřebného ke standardizaci odměrného roztoku hydroxidu sodného bylo podle vzorce:

$$m = M_r \cdot V \cdot c \quad (7)$$

kde m je hmotnost dihydrátu kyseliny šťavelové, V je objem roztoku, M_r je relativní molekulová hmotnost dihydrátu kyseliny šťavelové a c je požadovaná koncentrace $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Skutečná koncentrace $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se přepočítala podle vzorce:

$$c_s = \frac{m_s}{M_r \cdot V} \quad (8)$$

kde c_s je skutečná koncentrace $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, m_s je skutečná navážka dihydrátu kyseliny šťavelové a veličiny M_r a V jsou popsány výše v rovnici (7) [32].

Pro standardizaci odměrného roztoku hydroxidu sodného (NaOH) byla potřebná chemická rovnice reakce dihydrátu kyseliny šťavelové s hydroxidem sodným za vzniku šťavelanu sodného a vody:



Následně se použil již upravený vzorec podle rovnice (9) pro stanovení koncentrace hydroxidu sodného ve tvaru:

$$c_{\text{NaOH}} = 2 \cdot \frac{c_{\text{S}} \cdot V_{\text{S}}}{V_{\text{NaOH}}} \quad (10)$$

kde c_{NaOH} je koncentrace hydroxidu sodného, c_{S} je koncentrace kyseliny šťavelové, V_{S} je objem kyseliny šťavelové a V_{NaOH} je objem spotřebovaného hydroxidu sodného [32]. Pak byla nutná standardizace odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl), zde se použila reakce kyseliny chlorovodíkové s hydroxidem sodným za vzniku chloridu sodného a vody podle chemické rovnice:



Následně podle směšovací rovnice byl získán vzorec pro stanovení koncentrace kyseliny chlorovodíkové ve tvaru:

$$c_{\text{HCl}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{HCl}}} \quad (12)$$

kde c_{HCl} je koncentrace kyseliny chlorovodíkové, c_{NaOH} je koncentrace hydroxidu sodného, V_{NaOH} je objem hydroxidu sodného a V_{HCl} je objem kyseliny chlorovodíkové [32].

Dále se spočítalo množství nezreagované HCl pomocí vzorce:

$$V_{\text{nHCl}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOHtit.}}}{c_{\text{HCl}}} \quad (13)$$

kde V_{nHCl} je objem nezreagované HCl, c_{NaOH} je koncentrace NaOH, $V_{\text{NaOHtit.}}$ je objem titrační spotřeby NaOH k dotitrování roztoku a c_{HCl} je koncentrace HCl [32].

Spotřeba kyseliny chlorovodíkové k neutralizaci navážky popela byla vypočtena ze vztahu:

$$V_1 = V_{\text{HCl}} - V_{\text{nHCl}} \quad (14)$$

kde V_{HCl} je titrační spotřeba HCl a veličina V_{nHCl} je popsána výše v rovnici (13) [32].

Přepočet na jednotkovou koncentraci kyseliny byl proveden dle vzorce:

$$A_{\text{p}} = \frac{c_{\text{HCl}} \cdot V_1}{c_{\text{j}}} \quad (15)$$

kde A_{p} je alkalita popela vztažena na jednotkovou koncentraci, c_{HCl} je koncentrace kyseliny chlorovodíkové, V_1 je veličina popsána v rovnici (14) a c_{j} je jednotková koncentrace kyseliny [32].

Nakonec se provedl přepočet alkality popela na gram popela pomocí vztahu:

$$A = \frac{A_p}{m_p} \quad (16)$$

kde A_p je veličina z rovnice (15), m_p je navážka popela [32].

4.2.4 Stanovení tuku pomocí automatickým extraktorem Soxtherm

- Do extrakčních patron byly naváženy zhomogenizované vzorky o hmotnosti přibližně 10 g s přesností na čtyři desetinná místa. Patrona se utěsnila vatou a vložila do střední části skleněných extrakčních nádob, které se zalily 100 ml petroletheru. Byla provedena extrakce v autoextraktoru Soxtherm. Použitý program je uveden v tabulce 6. Extrakty byly přelity do destilačních baněk. Zbývající rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce (při teplotě 25 °C po dobu 4 min). Baňky byly vysušeny v sušárně (při teplotě 105 °C po dobu 15 min). Po ochlazení byly získané extrakty zváženy.

Tabulka 6 Extrakční program pro rozpouštědlo petrolether

Extrakční teplota	150 °C
Redukční interval	4 min
Redukční puls	4 s
Horká extrakce	30 min
Evaporace A	5x interval
Extrakční čas	1 h 10 min
Evaporace B	3x interval
Evaporace C	0 min
Délka programu	2 h 12 min

- Výsledná hmotnost extraktu se vztáhla na hmotnost vzorku a vyjádřila se v hmotnostních procentech jako:

$$w = \frac{m_E}{m_{vz}} \cdot 100 \quad (17)$$

kde m_E je hmotnost extraktu a m_{vz} je hmotnost vzorku [38].

4.2.5 Stanovení theobrominu a kofeinu pomocí HPLC

- Navážka vzorků byla zhruba 1 g s přesností na čtyři desetinná místa. Bylo přidáno 70 ml horké vody, krouživými pohyby se baňka promíchala umístila do ultrazvukové lázně na teplotu 70 °C po dobu 30 minut. Pak se baňka nechala ochladit na laboratorní teplotu a byla doplněna vodou po rysku do objemu 100 ml. Připravené roztoky byly zfiltrány dvakrát přes skládaný filtr a filtráty byly zfiltrány ještě jednou přes membránový filtr. Vzorky byly proměřeny třikrát.
- Stanovení theobrominu a kofeinu bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-10 s DAD detektorem. Parametry pro měření jsou uvedeny v následujících tabulkách 7 a 8. K identifikaci a kvantifikaci byla použita kalibrační křivka theobrominu a kofeinu.

Tabulka 7 Parametry pro stanovení theobrominu a kofeinu

Přístroj	Shimadzu LC-10
Kolona	Kinetex 5 µm EVO C18 (250 x 4,6 mm)
Mobilní fáze	destilovaná voda (A) : acetonitril (B) v poměru 85:15
Objem nástřiku	10 µl
Průtok mobilní fáze	0,8 ml.min ⁻¹
Teplota na koloně	26 °C

Tabulka 8 Detekce HPLC

Detektor	DAD
Vlnová délka	270 nm

4.2.6 Stanovení tukuprosté kakaové sušiny

- Ze stanovení obsahu theobrominu a kofeinu se stanovil obsah tukuprosté kakaové sušiny (TKS) podle normy ČSN 56 0578, který je vyjádřený v g/100 g vzorku a byl vypočítán ze vzorce:

$$\text{TKS} = (\text{K} + \text{T}) \cdot 36,1 \quad (18)$$

kde K je obsah kofeinu v g/100 g, T je obsah theobrominu v g/100 g a 36,1 je faktor odvozený z průměrného obsahu kofeinu a theobrominu v tukuprosté kakaové sušině.

4.2.7 Stanovení sacharózy metodou HPLC

- Byly naváženy vzorky o hmotnosti přibližně 1 g s přesností na čtyři desetinná místa. Byla namíchána směs voda:96% ethanol v poměru (70:30). Do této směsi byl vložen vzorek, který pak byl protřepán a promíchán a uložen do ultrazvukové lázně o teplotě na 35 °C po dobu 30 minut. Vzorky byly zfiltrány přes skládaný filtr a potom ještě jednou přes membránový filtr. Takto připravené vzorky byly proměřeny třikrát.
- Navážka vzorků byla zhruba 1 g s přesností na čtyři desetinná místa. Přidalo se 70 ml horké vody, krouživými pohyby se baňka promíchala umístila do ultrazvukové lázně na teplotu 70 °C po dobu 30 minut. Pak se baňka nechala ochladit na laboratorní teplotu a byla doplněna vodou po rysku do objemu 100 ml. Připravené roztoky byly zfiltrány přes skládaný filtr a filtráty byly zfiltrány ještě jednou přes celulókový filtr. Vzorky byly proměřeny ve třech opakováních.
- Stanovení sacharidů bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent Infinity 1260 s ELSD detektorem. Parametry pro měření jsou uvedeny v následujících tabulkách 9 a 10. K identifikaci a kvantifikaci byl použit standard sacharózy.

Tabulka 9 Parametry pro analýzu HPLC

Přístroj	Aglient Infinity 1260
Kolona	Prevail Carbohydrate ES 5u (250 x 4,6 mm)
Mobilní fáze	destilovaná voda (A) : acetonitril (B) v poměru 25:75
Objem nástriku	10 μl
Průtok mobilní fáze	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Tabulka 10 Parametry pro detektor

Detektor	ELSD
Evaporační teplota	65 $^{\circ}\text{C}$
Nebulizační teplota	95 $^{\circ}\text{C}$
Průtok plynu (dusík)	1,3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

4.2.8 Stanovení celkového dusíku

- Byly naváženy vzorky po asi 1 g s přesností na čtyři desetinná místa a byly vloženy do mineralizačních trubic. Ke každému vzorku byly přidány 2 g Weiningerova katalyzátoru a 10 ml koncentrované kyseliny sírové. Trubice se vložily do mineralizačního bloku Kjeldatherm a byla provedena optimalizace použitých programů.
- Pak byla provedena standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného. Z roztoku dihydrátu kyseliny šťavelové o koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo napipetováno přesně 10 ml do titrační baňky, přidaly se tři kapky fenolftaleinu a titrovalo se $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem hydroxidu sodného do prvního trvalého růžového zbarvení. Titrace byla provedena třikrát.
- V dalším kroku byla udělána standardizace odměrného roztoku kyseliny sírové, kdy se do titrační baňky napipetovalo přesné množství 10 ml $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku kyseliny sírové, přidaly se tři kapky Tashirova indikátoru a titrovalo se odměrným roztokem hydroxidu sodného do prvního trvalého žlutého zbarvení a titrace byla třikrát zopakována.
- K mineralizovaným vzorkům bylo po vychladnutí přidáno pár kapek vody, aby došlo k jeho rozpuštění a kapka fenolftaleinu. Do 500 ml titrační baňky bylo přidáno 25 ml $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny sírové. Rozpuštěné mineralizáty byly umístěny do destilačního přístroje Vapodest 200 podle metody uvedené v tabulce 11, který automaticky přidal množství hydroxidu sodného. Obsah titrační baňky byl titrován $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydroxidem sodným na tři kapky Tashirova indikátoru do prvního trvale žlutého zbarvení.

Tabulka 11 Parametry destilačního programu

Název metody	Chocolate TKN
Přídavek NaOH	80 ml
Reakční čas	0 min
Destilační čas	4 min
Síla páry	100 %

- Výpočet teoretické navážky dihydrátu kyseliny šťavelové ((COOH)₂·2H₂O) pro přípravu roztoku o koncentraci 0,05 mol·l⁻¹ potřebného ke standardizaci odměrného roztoku hydroxidu sodného byl proveden podle vzorce:

$$m = M_r \cdot V \cdot c \quad (19)$$

kde m je hmotnost dihydrátu kyseliny šťavelové, M_r je relativní molekulová hmotnost dihydrátu kyseliny šťavelové, V je objem roztoku a c je požadovaná koncentrace (COOH)₂·2H₂O.

Pro výpočet přesné koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného (NaOH) je potřebná chemická rovnice reakce dihydrátu kyseliny šťavelové s hydroxidem sodným za vzniku šťavelanu sodného a vody:

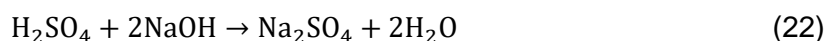


Koncentraci hydroxidu sodného vypočteme podle následujícího vzorce:

$$c_{\text{NaOH}} = 2 \cdot \frac{m_s \cdot V_s}{M_r \cdot V \cdot V_{\text{NaOH}}} \quad (21)$$

kde c_{NaOH} je koncentrace hydroxidu sodného, m_s je navážka kyseliny šťavelové, V_s je objem kyseliny šťavelové, M_r je relativní molekulová hmotnost dihydrátu kyseliny šťavelové, V je celkový objem a V_{NaOH} je objem spotřebovaného hydroxidu sodného [32].

Přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové (H₂SO₄) je vypočítána za pomoci chemické rovnice jako reakce kyseliny sírové s hydroxidem sodným za vzniku síranu sodného a vody ve tvaru:



Pak přejdeme k výpočtu přesné koncentrace (H₂SO₄) upraveným vztahem:

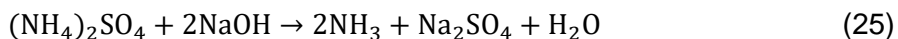
$$c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2 \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4}} \quad (23)$$

kde c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku NaOH, V_{NaOH} je titrační spotřeba hydroxidu sodného pro standardizaci H₂SO₄ a V_{H₂SO₄} je napipetovaný objem z odměrného roztoku H₂SO₄.

Rovnice pro stanovení celkového dusíku dle Kjeldahla jsou uvedeny níže, první z rovnic je reakce dusíku s kyselinou sírovou za vzniku síranu amonného:



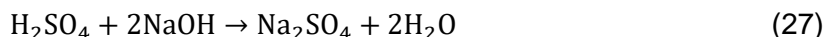
V další rovnici je uvedena reakce síranu amonného s hydroxidem sodným za vzniku amoniaku, síranu sodného a vody:



Třetí rovnice vyjadřuje reakci amoniaku s kyselinou sírovou za vzniku síranu amonného a přebytek kyseliny sírové:



Poslední rovnicí je reakce kyseliny sírové a hydroxidu sodného za vzniku síranu sodného a vody:



Celkový obsah kyseliny sírové má vztah:

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ celk.}} = c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ celk.}} \quad (28)$$

kde $c_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ je koncentrace kyseliny sírové získaná ze vztahu (23) a $V_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ celk.}}$ je objem přidavku kyseliny sírové v předloze.

Nadbytečná kyselina sírová má upravený vztah ve tvaru:

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ nadb.}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \quad (29)$$

kde c_{NaOH} je koncentrace hydroxidu sodného ze vztahu (21) a V_{NaOH} je titrační spotřeba NaOH vzorku.

Zreagovaná kyselina sírová má vztah:

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ zreag.}} = n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ celk.}} - n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ nadb.}} \quad (30)$$

Vzniklý amoniak odpovídá látkovému množství dusíku ve tvaru:

$$\frac{n_{\text{NH}_3}}{n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ zreag.}}} = \frac{2}{1} \Rightarrow n_{\text{NH}_3} = 2 \cdot n_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ zreag.}} = n_{\text{N}} \quad (31)$$

Nakonec obsah celkového dusíku je vypočítán podle upraveného vzorce a vyjádřen v procentech:

$$w_N = \frac{m_N}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100 = \frac{n_N \cdot M_N}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100 = \frac{2 \cdot n_{\text{H}_2\text{SO}_4\text{zreag.}} \cdot M_N}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100 =$$

$$= \frac{2 \cdot \left(c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4\text{celk.}} - \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \right) \cdot M_N}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100 \quad (32)$$

4.2.9 Stanovení draslíku

- Byly naváženy vzorky popela o hmotnosti přibližně 0,1 g s přesností na čtyři desetinná místa. Vzorky byly převedeny do teflonových vialek, byly zality 5 ml 67% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Připravené teflonové vialky byly umístěny do držáku a vloženy do mikrovlnky, kde probíhal rozklad podle programu uvedeného v tabulce 12. Po mineralizaci se vialky zchladily na laboratorní teplotu a převedly do 100 ml odměrné baňky a doplněny po rysku ultra čistou vodou pro ICP.

Tabulka 12 Program pro mineralizaci

Krok	čas [min]	příkon [W]
1	2	250
2	2	0
3	2	250
4	5	500

- Před vlastním měřením bylo nutné připravené mineralizáty 5x zředit. Pak bylo provedeno měření na ICP-OES.

Tabulka 13 Parametry přístroje Ultima 2

Příkon	1 300 W	
Zmlžovač	průtok	0,85 ml·min ⁻¹
	tlak	3,02 Ba
Plyny	plasmový	14,12 l·min ⁻¹
	pomocný	0,305 l·min ⁻¹
	nosný	0,491 l·min ⁻¹
Vlnová délka K	766,490 nm	

4.2.10 Stanovení toxických prvků (Cd, Cu)

- Byla navážena hmotnost vzorků popela o hmotnosti přibližně 0,2 g s přesností na čtyři desetinná místa. Vzorky byly převedeny do teflonových vialek, byly zality 5 ml 67% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Vialky byly umístěny do držáku a vloženy do mikrovlnky, kde probíhal rozklad podle programu uvedeného v kapitole 3.2.9 tabulky 12. Po mineralizaci se vialky zchladily, kvantitativně se převedly do 25 ml odměrných baněk a doplnily ultra čistou ICP vodou po rysku.
- Vzorky byly měřeny na ICP-OES Ultima 2 a parametry jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14 Parametry přístroje Ultima 2

Příkon	1 300 W	
Zmlžovač	průtok	0,85 ml·min ⁻¹
	tlak	3,02 Ba
Plyny	plasmový	14,12 l·min ⁻¹
	pomocný	0,305 l·min ⁻¹
	nosný	0,491 l·min ⁻¹
Vlnová délka Cd	214,438 nm	
Vlnová délka Cu	327,396 nm	

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Nepřímé stanovení vody metodou sušení

Stanovení obsahu vody bylo provedeno na základě postupu, uvedeného v kapitole 4.2.1 a pro výpočet byla použita rovnice (5). Analyzované vzorky byly změřeny ve třech opakováních, z nichž byla vypočtena průměrná hodnota. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15 Výsledné hodnoty vzorků pro stanovení obsahu vody

Vzorek	m _{FW} [g]	m _{DW} [g]	Δ m [g]	w [hm.%]
1.I	5,1783	4,8741	0,3042	5,87
1.II	5,1694	4,8645	0,3049	5,90
1.III	5,2897	4,9779	0,3118	5,89
			Ø	5,89
2.I	5,0630	4,8240	0,2390	4,72
2.II	5,0673	4,8289	0,2384	4,70
2.III	5,4885	5,2326	0,2559	4,66
			Ø	4,70
3.I	5,1345	5,0295	0,1050	2,04
3.II	5,1588	5,0467	0,1121	2,17
3.III	5,1475	5,0336	0,1139	2,21
			Ø	2,14
4.I	5,2151	4,9357	0,2794	5,36
4.II	5,0833	4,8095	0,2738	5,39
4.III	5,1627	4,8803	0,2824	5,47
			Ø	5,40

Nejvyšší obsah vody 5,89 % obsahoval vzorek č. 1. Nejméně vody 2,14 % bylo ve vzorku č. 3 v kakaové hmotě. Vzorek pražených kakaových bobů obsahoval 4,70 % a vzorek čajové směsi z kakaových bobů měl 5,40 % vody. Ze získaných hodnot je patrné, že vzorky 2 a 3 měly srovnatelný obsah vody než zbylé dva vzorky. Výsledné hodnoty se blíží hodnotám uváděným v literatuře [11].

5.2 Vážkové stanovení popela

Stanovení popela bylo provedeno na základě kapitoly 4.2.2 a pomocí rovnice (6) byl vypočítán průměrný obsah popela. Vzorky byly proměřeny třikrát a z těchto hodnoty byla vypočtena průměrná hodnota obsahu popela.

Tabulka 16 Výsledky stanovení popela

Vzorek	m1	m2	wp [hm.%]
1.I	2,0254	0,2346	11,58
1.II	2,1527	0,2493	11,58
1.III	2,0971	0,2421	11,54
		Ø	11,57
2.I	2,1693	0,0859	3,96
2.II	2,1721	0,0882	4,06
2.III	2,0713	0,0833	4,02
		Ø	4,01
3.I	2,0471	0,0701	3,42
3.II	2,0448	0,0707	3,46
3.III	2,0666	0,0710	3,44
		Ø	3,44
4.I	2,0619	0,0808	3,92
4.II	2,0625	0,0807	3,91
4.III	2,0561	0,0791	3,85
		Ø	3,89

Porovnáním získaných hodnot u jednotlivých vzorků, uvedených v tabulce 16, je patrné, že obsah popela byl u všech vzorků přibližně stejný až na vzorek kakaového prášku, který jako jediný výrazně přesahoval hodnotu uváděnou v literatuře [11] 11,57 hm.%. Ostatní analyzované vzorky měly obsah popela v rozmezí 3,44-4,01 hm.%.

5.3 Stanovení alkality popela

Alkalita popela byla stanovena podle kapitoly 4.2.3.

Tabulka 17 Spotřeby NaOH při standardizaci odměrných roztoků

	standardizace NaOH [ml]	standardizace HCl [ml]
spotřeba NaOH	9,70	8,90
	9,70	8,85
	9,70	8,90
Ø	9,70	8,90

Nejvyšší alkalitu popela měl vzorek 1 s hodnotou 11,74 ml·g⁻¹, který představoval kakaový prášek, který je alkalizovaný, čehož se využívá k jeho lepší rozpustnosti [30]. Zbývající vzorky měly přibližně stejné hodnoty od 7,34 do 7,96 ml·g⁻¹. Získané hodnoty jsou vyšší, než uvádí literatura [11], což mohlo být způsobeno nedostatečným procesem spálení vzorků nebo nedostatečným promýváním filtru vroucí vodou, kdy nedošlo k úplnému vymizení kyselé reakce.

Tabulka 18 Naměřené a vypočtené hodnoty ke stanovení alkality popela

Vzorek	m _p [g]	V _{HCl} [ml]	V _{NaOH} [ml]	V _N [ml]	V ₁ [ml]	Ap [ml]	A [ml·g ⁻¹]
1.I	0,0691	2,60	5,20				
1.II	0,0688	2,70	5,40				
1.III	0,0692	2,60	5,20				
Ø	0,0690	2,63	5,27	5,43	7,37	0,81	11,74
2.I	0,0671	1,00	6,50				
2.II	0,0659	1,10	6,60				
2.III	0,0670	1,00	6,50				
Ø	0,0667	1,03	6,53	6,74	4,50	0,50	7,43
3.I	0,0688	1,20	6,30				
3.II	0,0673	1,20	6,30				
3.III	0,0672	1,10	6,20				
Ø	0,0678	1,17	6,27	6,46	4,90	0,54	7,96
4.I	0,0627	1,00	6,60				
4.II	0,0691	1,10	6,70				
4.III	0,0660	1,00	6,60				
Ø	0,0659	1,03	6,63	6,84	4,40	0,48	7,34

5.4 Stanovení tuku automatickým extraktorem Soxtherm

Celkový obsah tuku byl stanoven postupem uvedeným v kap. 4.2.4. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 19.

Tabulka 19 Výsledné hodnoty ke stanovení celkového obsahu tuku

Vzorek	m _{vz} [g]	m ₁ [g]	m ₂ [g]	Δm [g]	w [hm.%]
1.I	10,3690	130,7919	131,8685	1,0766	10,38
1.II	10,0164	62,7292	63,6079	0,8787	8,77
1.III	10,4644	63,4425	64,3104	0,8679	8,29
				Ø	9,15
2.I	10,1833	121,3185	123,6678	2,3493	23,07
2.II	10,5800	121,3185	123,8084	2,4899	23,53
2.III	10,3700	121,3185	123,6234	2,3049	22,23
				Ø	22,94
3.I	10,4331	62,7292	66,9074	4,1782	40,05
3.II	10,2888	62,7292	66,8970	4,1678	40,51
3.III	10,2080	62,7292	67,3050	4,5758	44,83
				Ø	41,79
4.I	10,0627	63,4425	65,4707	2,0282	20,16
4.II	10,5315	63,4425	65,5243	2,0818	19,77
4.III	10,0223	63,4425	65,8094	2,3669	23,62
				Ø	21,18

Nejnižší obsah 9,15 hm.% měl vzorek kakaového prášku, což bylo potvrzeno podle literatury [30], kdy z hlediska zpracování se kakaový prášek zbavuje kakaového másla. Nejvíce tuku

obsahovala kakaová hmota s 41,79 hm.%. Kakaové boby (vzorek 2) a čajová směs z kakaových bobů (vzorek 4) měly hodnoty přibližně stejné. Hodnoty výtěžků jsou menší, než uvádí literatura [11], což mohlo být zapříčiněno přeléváním extraktů do destilačních baněk z extrakčních patron a ulpěním kapek tuku na stěnách.

5.5 Stanovení theobrominu a kofeinu metodou HPLC

V rámci optimalizace metody HPLC byly použity tyto parametry:

Tabulka 20 Parametry použité kolony HILIC pro optimalizaci HPLC

Kolona	Kinetex 2.6µm HILIC 100A HPLC Column (100 x 4.6 mm)
Teplota	26 °C

Pro optimalizaci byly proměřeny standardy těmito kroky:

Theobromin:

1. Složení MF bylo voda:acetonitril v poměru (90:10) při průtoku $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a koncentraci roztoku $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.
2. Byl použit 10x zředěný standard o koncentraci $0,02 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, mobilní fáze pro HPLC byla voda:acetonitril v poměru (90:10) a při průtoku $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Kofein:

1. Byl použit standard o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, složení mobilní fáze bylo voda:acetonitril (90:10) a průtokem $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
2. Složení MF bylo z vody:acetonitrilu v poměru (90:10) při průtoku $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a použitý standard měl koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Theobromin + kofein:

Byl použit roztok se standardy o koncentraci $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ theobrominu a 10x zředěný standard kofeinu o koncentraci $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

1. Složení MF bylo voda:acetonitril (90:10) s průtokem $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
2. V tomto kroku bylo pozměněn poměr ve složení MF voda:acetonitril (95:5) o průtoku $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

V další fázi byla použita kolona uvedená v tabulce 21.

Tabulka 21 Parametry použité kolony pro HPLC

Kolona	Kinetex 5 µm EVO C18 (250 x 4,6 mm)
Teplota	26 °C

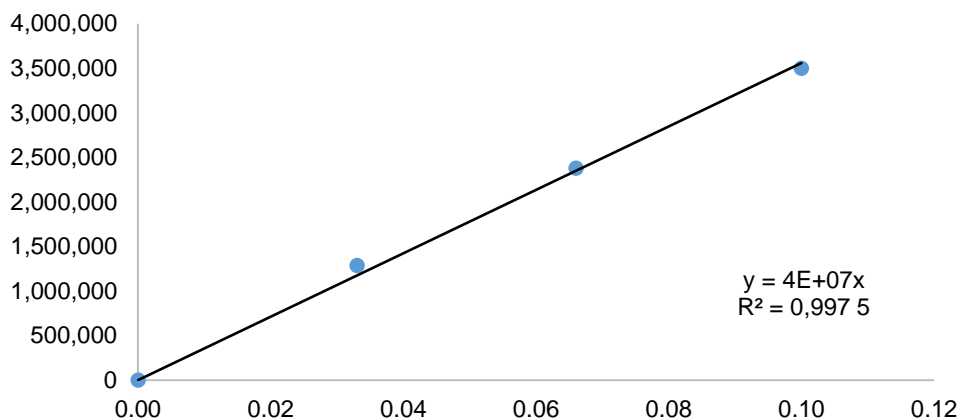
K dosažení optimalizace byly provedeny následující kroky:

Theobromin + kofein:

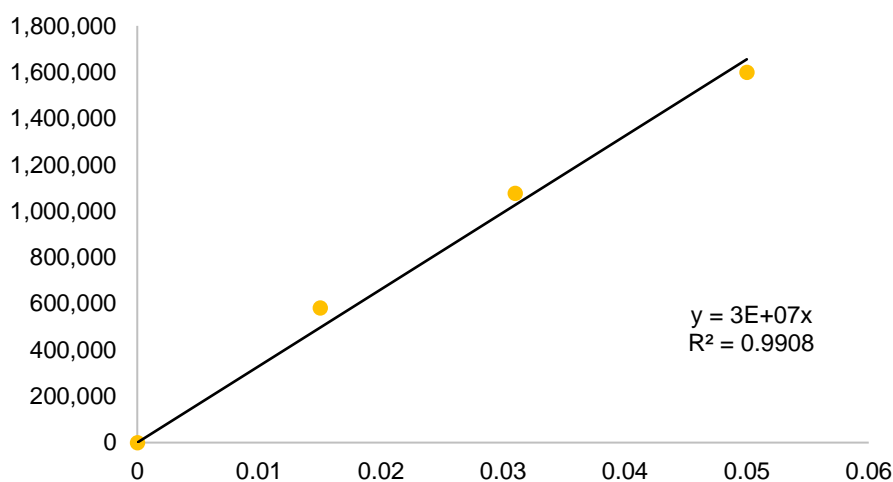
Byl použit roztok se standardy theobrominu o koncentraci $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a 10x zředěný roztok kofeinu o koncentraci $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

1. Složení mobilní fáze voda:acetonitril (90:10) a průtokem $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
2. Ve druhém kroku bylo změněno složení MF voda:acetonitril v poměru (85:15), průtok byl zachován na $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Tento krok byl použit u vlastního stanovení vzorků.

Z kalibrační závislosti uvedené v grafu 1 a grafu 2 podle postupu kapitoly 4.1.2 byly získány rovnice regrese, z nichž byly vypočteny koncentrace theobrominu a kofeinu ve vzorcích.



Graf 1 Kalibrační závislost theobrominu

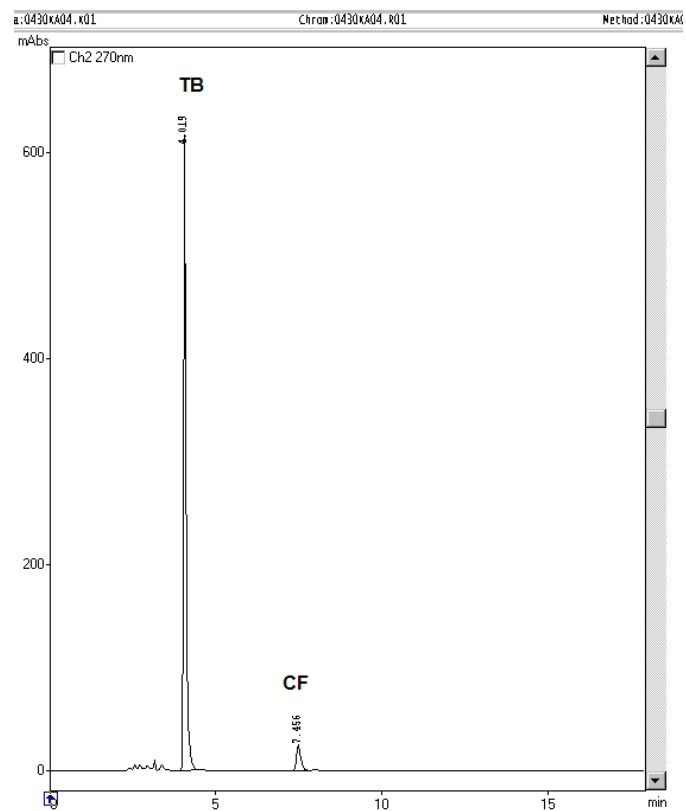


Graf 2 Kalibrační závislost kofeinu

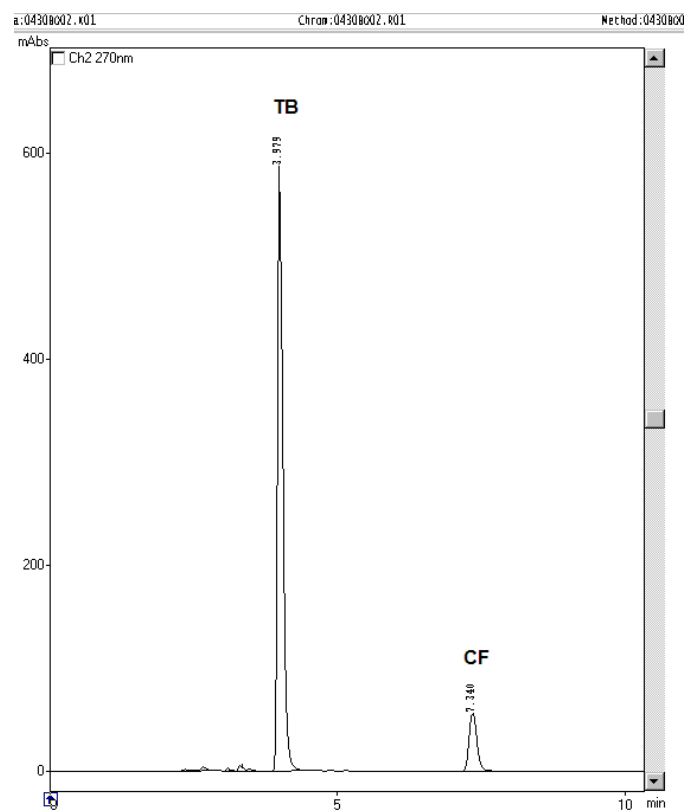
V tabulce 22 jsou uvedeny průměrné hodnoty plochy píků a koncentrací ze třech opakování. V grafech 4–6 jsou znázorněny příklady chromatogramů jednotlivých vzorků.

Tabulka 22 Stanovené koncentrace theobrominu TB a kofeinu CF

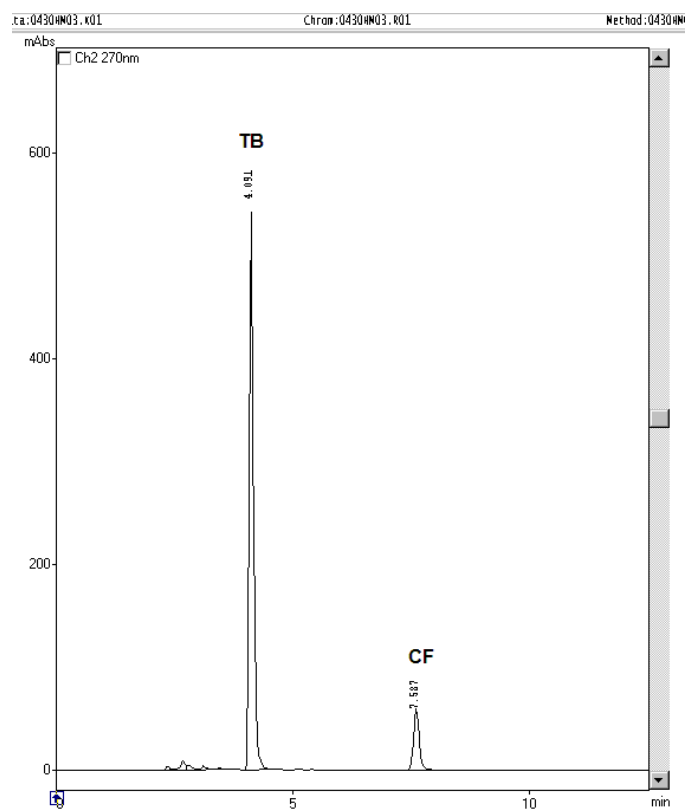
Vzorky	plocha píku TB	plocha píku CF	koncentrace TB [g·l ⁻¹]	koncentrace CF [g·l ⁻¹]	koncentrace TB [mg·l ⁻¹]	koncentrace CF [mg·l ⁻¹]
1	3567253	222266	0,17836	0,01482	178,36	14,82
2	3363570	482892	0,08409	0,01610	84,09	16,10
3	3298477	476114	0,08246	0,01587	82,46	15,87
4	3318037	477388	0,08295	0,01591	82,95	15,91



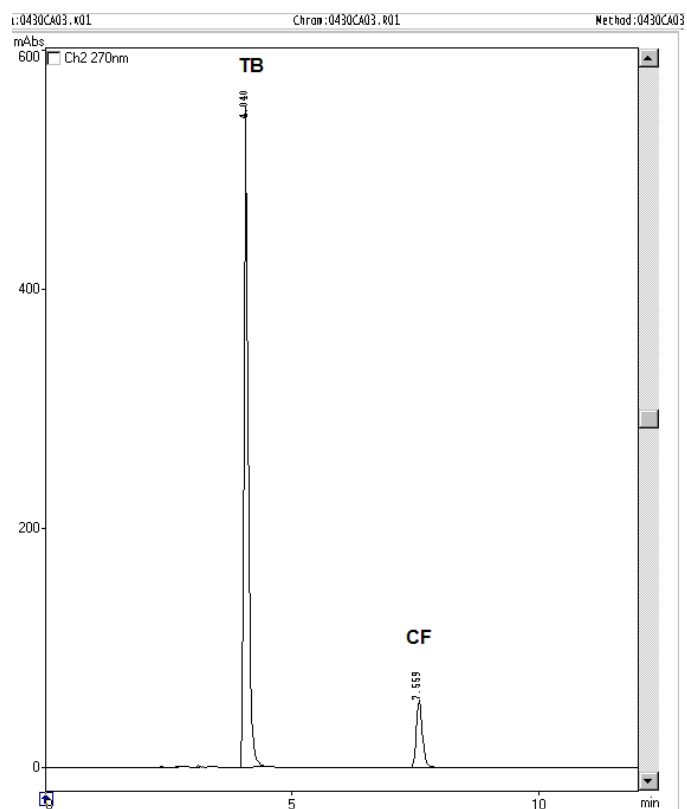
Graf 3 Příklad chromatogramu vzorku kakaového prášku



Graf 4 Příklad chromatogramu vzorku kakaových bobů



Graf 5 Chromatograf vzorku kakaové hmoty



Graf 6 Chromatogram vzorku čajové směsi z kakaových bobů

Nejvyšší koncentrace theobrominu a kofeinu vykazoval vzorek 1 - kakaový prášek, zbylé vzorky měly obdobné výsledné hodnoty. Podle literatury [11] má nejvyšší obsah theobrominu kakaový prášek $178,36 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kakaová hmota měla koncentraci $82,46 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pražené kakaové boby $84,09 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a čajová směs z kakaových bobů $82,95 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Obecně obsah kofeinu bývá o řád nižší než theobrominu. V kakaovém prášku byl obsah kofeinu $14,82 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v pražených kakaových bobech $16,10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, v kakaové hmotě $15,87 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a v čajové směsi z kakaových bobů $15,91 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

5.6 Stanovení tukuprosté kakaové sušiny

Získané hodnoty koncentrací z kap. 5.5 byly převedeny na koncentraci v g/100 g. Tukuprostá kakaová sušina byla vypočítána ze vztahu (18). Nejvíce tukuprosté kakaové sušiny obsahoval vzorek kakaového prášku (vzorek 1) s hodnotou 58,22 g/100 g. Zbylé vzorky měly srovnatelně výsledné hodnoty TKS. Pražené kakaové boby měly 35,34 g/100 g, kakaová hmota 33,97 g/100 g a čajová směs z kakaových bobů 34,96 g/100 g. Výsledky odpovídají porovnáním s literaturou [41].

Tabulka 23 Vypočtené hodnoty TKS

vzorky	$m_{\text{vzorku}} [\text{g}]$	koncentrace TB [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	koncentrace CF [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	koncentrace TB [g/100 g]	koncentrace CF [g/100 g]	TKS [g/100 g]
1	1,1978	178,36265	14,81773	1,489085	0,123708	58,22
2	1,0235	84,089250	16,09640	0,821585	0,157268	35,34
3	1,0450	82,461925	15,87047	0,789109	0,151870	33,97
4	1,0210	82,950925	15,91293	0,812448	0,155856	34,96

5.7 Stanovení sacharózy pomocí HPLC

V rámci optimalizace byly připraveny roztoky vzorků dvěma způsoby:

1. Navážka přibližně 1 g vzorku byla dána do směsi voda:ethanol 96% v poměru 70:30. Roztoky byly umístěny do ultrazvukové lázně s teplotou 35°C na 30 minut, poté byly zfiltrány přes skládaný filtr.
2. Byl navážen asi 1 g vzorku, který byl zalit 70 ml horké vody, odměrná baňka se promíchala krouživými pohyby a umístila na 30 min do ultrazvukové lázně vytemperované na 70°C . Po vyjmutí z lázně byla baňka ochlazená na laboratorní teplotu a doplněna vodou po rysku do celkového objemu 100 ml. Roztoky vzorků byly přefiltrovány přes skládaný filtr.

Z výsledků, uvedených v tabulkách 24 a 25, je patrné, že lepší výtěžnosti se získalo ze směsi voda:ethanol. Další vypozařovanou věcí byla detekce ostatních cukrů. U směsi v prvním kroku byly stabilně detekovány další cukry. U vzorků z kroku dva, kdy byla použita jen voda, byly výtěžnosti sacharózy menší a u ostatních cukrů byly značné rozdíly v jejich detekci, kdy přístroj neposkytl odezvu kvůli malé koncentraci v nástřiku. Důvodem malé koncentrace v nástřiku mohla být horší extrakce cukrů do roztoku nebo chyby v nepřesném pipetování.

Nejvíce sacharózy obsahovaly vzorky pražených kakaových bobů a čajové směsi z kakaových bobů. Menší množství pak bylo detekováno u kakaového prášku a kakaové hmoty.

Tabulka 24 Voda+EtOH

Vzorek	c [mg·l ⁻¹]
1.I	22,006
1.II	20,968
1.III	23,172
Ø	22,04867
2.I	68,145
2.II	67,927
2.III	69,11
Ø	68,394
3.I	27,75
3.II	26,827
3.III	25,553
Ø	26,71
4.I	83,788
4.II	83,75
4.III	84,67
Ø	84,06933

Tabulka 25 Voda

Vzorek	c [mg·l ⁻¹]
1.I	25,33
1.II	25,784
1.III	23,448
Ø	24,854
2.I	56,312
2.II	54,952
2.III	58,803
Ø	56,689
3.I	25,926
3.II	26,126
3.III	0
Ø	17,35067
4.I	0
4.II	0
4.III	65,897
Ø	21,96567

5.8 Stanovení celkového dusíku

Byly použity následující teplotní programy v rámci optimalizace mineralizace. Optimálně zmineralizované vzorky poskytl program uvedený v kroku 3, tabulka 27.

1. Program s názvem: Mouka

Tabulka 26 Program mouka

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
1	410	60
2	0	30
chlazení		30

2. Program s názvem: Chocolate

Tabulka 27 Program chocolate

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
1	240	20
2	410	90
3	0	30
chlazení		30

3. Program s názvem: ZK 2

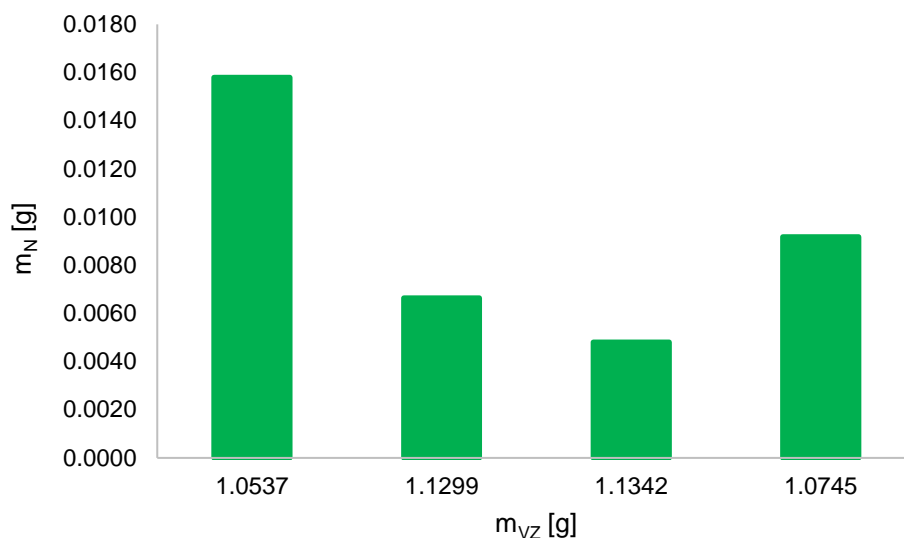
Tabulka 28 Program ZK 2

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
1	100	15
2	200	15
3	410	120
4	0	30
chlazení		30

Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kap. 0. Navážka dihydrátu kyseliny šťavelové činila 0,632 g. Podle vzorců použitých v kapitole 0 byla vypočtena koncentrace hydroxidu sodného při standardizaci na $0,0973 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při spotřebě 10,3 ml hydroxidu. U standardizace kyseliny sírové činila spotřeba hydroxidu 11,4 ml a přesná koncentrace byla $0,0555 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Obsah celkového dusíku byl vypočítán z rovnice (32) a výsledky průměrných hodnot jsou uvedeny v tabulce 29. Grafické znázornění je uvedeno v grafu 7. Výsledné hodnoty jsou nižší od výsledků uváděných v literatuře [11], což může být způsobeno nedostatečným procesem mineralizace. Vzorek kakaa vykazoval 1,58 % celkového množství dusíku, pražené kakaové boby 0,66 %, kakaová hmota 0,48 % a čajová směs z kakaových bobů 0,92 %.

Tabulka 29 Výsledné hodnoty pro stanovení dusíku

Vzorek	m_{vz} [g]	V 0,1M NaOH [ml]	V 0,1M NaOH [l]	m_{N} [g]	w_{N} [%]
1.I	1,0238	16,2			
1.II	1,0472	15,9			
1.III	1,0901	16,7			
Ø	1,0537	16,3	0,0163	0,0158	1,58
2.I	1,1473	22,9			
2.II	1,1183	23,8			
2.III	1,124	22,3			
Ø	1,1299	23,0	0,0230	0,0066	0,66
3.I	1,0843	23,6			
3.II	1,1667	25,0			
3.III	1,1515	24,9			
Ø	1,1342	24,5	0,0245	0,0048	0,48
4.I	1,0784	21,1			
4.II	1,0721	21,9			
4.III	1,0729	20,8			
Ø	1,0745	21,3	0,0213	0,0092	0,92



Graf 7 Obsah dusíku ve vzorcích

5.9 Stanovení draslíku

Draslík byl stanoven optickou emisní spektrometrií s indukčně vázanou plazmou podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.9. Nejdříve byla proměřena kalibrační závislost ve třech opakováních. Vypočítané průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 30. Pak byly proměřeny vzorky celkem třikrát, ze získaných hodnot byl vypočítán aritmetický průměr, který je uveden v tabulce 31 a grafu 8.

Z kalibrační křivky byla získána rovnice lineární regrese ve tvaru:

$$y = 701,27x + 2\,461,2 \quad (33)$$

$$I = 701,27c + 2\,461,2 \rightarrow c = \frac{I - 2\,461,2}{701,27} \quad (34)$$

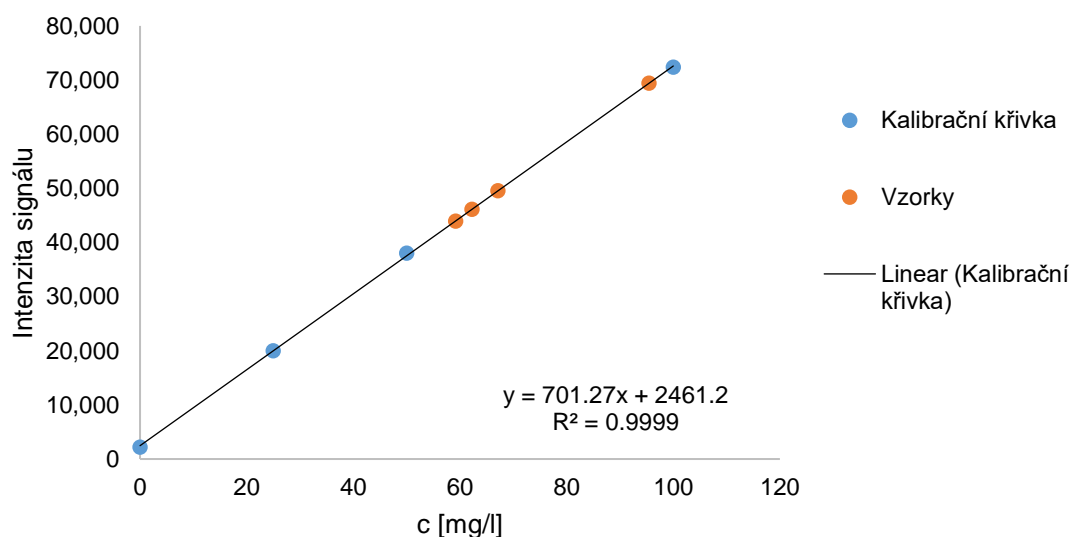
kde c je koncentrace draslíku [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$] a I je intenzita signálu. Podle rovnice 34 byla vypočtena koncentrace draslíku v jednotlivých vzorcích. Nejvyšší hodnotu vykazoval vzorek č. 1, v porovnání s literaturou [24; 25] byl obsah analyzovaných vzorků srovnatelné. Kakaový prášek obsahoval $95,48 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pražené kakaové boby $59,17 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kakaová hmota $67,12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a čajová směs z kakaových bobů $62,23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 31.

Tabulka 30 Kalibrační závislost draslíku

c [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	Intenzita signálu (I)
0	2213,17
25	20012,06
50	37992,18
100	72350,02

Tabulka 31 Hodnoty naměřených vzorků

Vzorek	Intenzita signálu (I)	c [mg·l ⁻¹]
1	69418,76	95,48
2	43957,39	59,17
3	49527,47	67,12
4	46103,76	62,23



Graf 8 Znáznornění kalibrační závislosti draslíku a analyzovaných vzorků

5.10 Stanovení toxických prvků (Cd, Cu)

Metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou provedenou podle kapitoly 4.2.10 byl stanoven obsah kadmia a mědi.

Kalibrační závislost kadmia měla regresní rovnici ve tvaru:

$$y = 271\,536x + 128,19 \quad (35)$$

$$I = 271\,536\,c + 128,19 \rightarrow c = \frac{I - 128,19}{271\,536} \quad (36)$$

kde I je intenzita signálu a c je koncentrace kadmia v jednotkách mg·l⁻¹. Kalibrace byla provedena ve třech sériích a průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 32. Jednotlivé vzorky byly proměřeny třikrát a výsledky jsou uvedeny v tabulce 33.

Tabulka 32 Kalibrační závislost kadmia

c [mg/l]	Intenzita signálu
0	1743,20
0,5	134451,63
1	271270,82
5	1358032,23

Tabulka 33 Výsledné hodnoty kadmia naměřených vzorků

Vzorky	Intenzita	c [mg/l]
1	3634,67	0,013
2	70368,81	0,259
3	63727,37	0,234
4	58160,44	0,214

Nařízení EU č. 488/2014 zavedlo s platností od 1. ledna 2019 pro kadmium limit v kakaovém prášku $0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Z tabulky 33 je zřejmé, že vzorek č. 1 tento limit splňuje, jeho koncentrace byla $0,013 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, což odpovídá koncentraci $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ uváděné v literatuře. Vzorek je z hlediska zdravotního rizika bezpečný. Matrice ostatních vzorků není v legislativě uvedena, ale musí splňovat zdravotní nezávadnost, nejvyšší tolerovaná hodnota v legislativě pro čokoládu s obsahem celkové kakaové sušiny nejméně 50 % je $0,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a nejnižší limit pro mléčnou čokoládu s obsahem celkové kakaové sušiny nižším než 30 % je $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Vzorky 2 až 4 měli koncentraci draslíku v rozmezí $0,214\text{--}0,259 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Regresní rovnice kalibrační závislosti mědi byla:

$$y = 80\,386x + 4\,923,1 \quad (37)$$

$$I = 80\,386c + 4\,923,1 \rightarrow c = \frac{I - 4\,923,1}{80\,386} \quad (38)$$

Kalibrace byla provedena ve třech opakováních, hodnoty byly zprůměrovány a jsou uvedeny v tabulce 34. Analyzované vzorky byly proměřeny také třikrát a v tabulce 35 jsou uvedeny jejich průměrné hodnoty. Všechny vzorky obsahovaly koncentraci mědi, která je považována za bezpečnou podle literatury [25; 27]. Vzorek kakaa měl koncentraci mědi $3,633 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pražené kakaové boby $5,201 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kakaová hmota $5,444 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a čajová směs z kakaových bobů $4,615 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tabulka 34 Kalibrační závislost mědi

c [mg/l]	Intenzita signálu
0	5514,41
0,5	45585,32
1	85604,37
5	411996,90

Tabulka 35 Naměřené hodnoty olova u studovaných vzorků

Vzorky	Intenzita	c [mg/l]
1	300628,8	3,633
2	428193,6	5,201
3	448007,2	5,444
4	380544,6	4,615

6 ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce byla analýza kakaového prášku, která byla porovnána s dalšími kakaovými produkty. Teoretická část práce se zabývá botanickou charakteristikou kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*) a popisuje také biologicky aktivní látky obsažené v plodech kakaovníku. Do oblasti zájmu se dostaly zejména látky theobromin a kofein, které patří mezi purinové alkaloidy a po konzumaci mají vliv na lidský organismus, zvláště na CNS. Požití produktů, obsahujících tyto látky, není nebezpečné, jsou-li užívány v přiměřeném množství. Další pozornost byla věnována technologickému zpracování kakaových bobů a jejich využití v potravinářském průmyslu. Na základě používaných metod byla vypracována instrumentace diplomové práce.

Experimentální část byla zaměřena na použití metod uvedených v instrumentaci při měření jednotlivých parametrů reálných vzorků. Stanoveny byly tyto parametry: obsah vody, popel, alkalita popela, celkový tuk, theobromin a kofein, tukuprostá kakaová sušina, sacharóza, celkový dusík, draslík a toxické prvky. V rámci diplomové práce bylo provedeno několik optimalizací vybraných metod, konkrétně optimalizace metody HPLC pro stanovení theobrominu a kofeinu, optimalizace roztoků ke stanovení sacharózy a optimalizace metody mineralizace pro určení celkového dusíku.

Bylo ověřeno, že největší obsah vody byl v kakaovém prášku 5,89 %. Nejméně vody bylo přítomno v kakaové hmotě 2,14 %. Vzorek pražených kakaových bobů měl 4,70 % a vzorek čajové směsi obsahoval 5,40 % vody. Obsah popela u analyzovaných vzorků byl u kakaového prášku výrazně vyšší, ostatní vzorky splňovaly dané rozmezí. Z hlediska alkality popela byla nejvyšší hodnota zaznamenána u kakaového prášku s $11,74 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$, ostatní analyzované vzorky měly přibližně stejné hodnoty $7,34\text{--}7,96 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$. Nejméně tuku bylo stanoveno u kakaového a to 9,15 hm.%, nejvyšší hodnotu měl vzorek kakaové hmoty s 41,79 hm.%. Vzorky pražených kakaových bobů a čajové směsi z kakaových bobů měly přibližně stejné hodnoty pohybující se v rozmezí 21,18–22,94 hm.%. U metody HPLC byl stanoven obsah theobrominu a kofeinu. Vzorek kakaového prášku měl nejvyšší obsah těchto látek, hodnoty zbývajících vzorků byly přibližně stejné. Tukuprostá kakaová sušina činila 58,22 g/100 g v kakaovém prášku, pražené kakaové boby obsahovaly 35,34 g/100 g, kakaová hmota 33,97 g/100 g a čajová směs z kakaových bobů 34,96 g/100 g. Obsah sacharózy byl u kakaových bobů a čajové směsi z kakaových bobů detekován v nejvyšším množství než u vzorků kakaového prášku a kakaové hmoty. Dále vzorek kakaového prášku obsahoval celkové množství dusíku 1,58 %, pražené kakaové boby měly 0,66 %, kakaová hmota 0,48 % a čajová směs z kakaových bobů 0,92 %. V rámci analýzy bylo stanoveno množství draslíku, kdy kakaový prášek obsahoval $95,48 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pražené kakaové boby $59,17 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kakaová hmota $67,12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a čajová směs z kakaových bobů $62,23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V rámci bezpečnosti potravin byla provedena analýza na toxické kovy, zejména na kadmium a měď. Všechny zanalyzované vzorky splňovaly limity a byly považovány za bezpečné.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] YAHIA, Elhadi. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health*. 2nd edition. Hoboken, NJ: Blackwell Publishing, 2018. ISBN 978-111-9157-960.
- [2] BADRIE, Neela, Frances BEKELE, Elzbieta SIKORA a Marek SIKORA. Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014, **55**(5), 620-659. DOI: 10.1080/10408398.2012.669428. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.669428>
- [3] ARCIMOVIČOVÁ, Jana a Pavel VALÍČEK. *Čokoláda pokrm bohů*. Benešov: Start, 1999. ISBN 80-86231-07-0.
- [4] DOUTRE-ROUSSEL, Chloé. *Čokoláda pro znalce: opravdová chuť i vášeň*. Praha: Slovart, 2006. ISBN 80-7209-825-x.
- [5] COE, Sophie a Michael COE. *Čokoláda: historie sladkého tajemství*. Praha: PRAGMA, 2000. ISBN 80-7205-478-3.
- [6] PEHLE, Tobias. *Čokoláda: [antidepresivum, afrodiziakum, antioxidant]*. 1. vyd. Čestlice: Rebo, 2009. ISBN 978-80-255-0049-1.
- [7] NOWAK, Bernd a Bettina SCHULZ. *Tropické plody: biologie, využití, pěstování a sklizeň*. Vyd. 1. V Praze: Knížní klub, 2002. Průvodce přírodou (Knížní klub). ISBN 80-242-0785-0.
- [8] CÉSPEDÉS, Carlos. *Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants*. Cambridge, MA: CAB International, 2013. ISBN 978-178-0642-338.
- [9] MOTAMAYOR, Juan, Philippe LACHENAUD a Jay DA SILVA E MOTA. *PLoS ONE*. 2008, **3**(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0003311. ISSN 1932-6203.
- [10] DOYLE, Michael a Larry BEUCHAT. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2007. ISBN 978-1-55581-407-6.
- [11] HRABĚ, Jan, Otakar ROP a Ignác HOZA. *Technologie výroby potravin rostlinného původu: bakalářský stupeň*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 80-7318-372-2.
- [12] NAIK, Bindu a Vijay KUMAR. Cocoa Butter and Its Alternatives: A Review. *Journal of Bioresource Engineering and Technology*. 2014, (2), 01-11.
- [13] RODRIGUEZ-CASADO, Arantxa. The Health Potential of Fruits and Vegetables Phytochemicals: Notable Examples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2013, **56**(7), 1097-1107 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1080/10408398.2012.755149. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2012.755149>
- [14] KHAN, Nasiruddin, Olha KHYMENETS, Mireia URPÍ-SARDÀ et al. Cocoa Polyphenols and Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease. *Nutrients* [online]. 2014, **6**(2), 844-880 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.3390/nu6020844. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/6/2/844>

- [15] ARAUJO, Quintino, James GATTWARD, Suzana ALMOOSAWI, Maria PARADA COSTA SILVA, Paulo DANTAS a Quintino ARAUJO JÚNIOR. Cocoa and Human Health: From Head to Foot—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, **56**(1), 1-12 [cit. 2019-02-30]. DOI: 10.1080/10408398.2012.657921. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2012.657921>
- [16] ORACZ, Joanna, Dorota ZYZELEWICZ a Ewa NEBESNY. The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, **55**(9), 1176-1192 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1080/10408398.2012.686934. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.686934>
- [17] ORACZ, Joanna a Ewa NEBESNY. Antioxidant Properties of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.): Influence of Cultivar and Roasting Conditions. *International Journal of Food Properties* [online]. 2015, **19**(6), 1242-1258 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1080/10942912.2015.1071840. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2015.1071840>
- [18] ČERVINKA, Otakar. *Chemie organických sloučenin*. První. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.
- [19] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018. ISBN 978-80-7592-013-3.
- [20] ELLAM, Samantha a Gary WILLIAMSON. Cocoa and Human Health. *Annual Review of Nutrition* [online]. 2013, **33**(1), 105-128 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071811-150642. ISSN 0199-9885. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-071811-150642>
- [21] FORD, K., Y. EBISUZAKI a P. BOYLE. Methylxanthines. II. Anhydrous Theobromine. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 1998, **54**(12), 1980-1983. DOI: 10.1107/S0108270198009469. ISSN 0108-2701. Dostupné také z: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0108270198009469>
- [22] WANG, Lin, Li-Da DU a Guan-Hua DU. Caffeine. DU, Guan-Hua. *Natural Small Molecule Drugs from Plants* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2018, s. 199-204 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1007/978-981-10-8022-7_32. ISBN 978-981-10-8021-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8022-7_32
- [23] CAMARGO, Marcio a Carmen CAMARGO. Effects of Caffeine on the Organism—Literature Review. *OALib* [online]. 2019, **06**(03), 1-7 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.4236/oalib.1105265. ISSN 2333-9721. Dostupné z: <http://www.oalib.com/paper/pdf/5304196>
- [24] KASPER, Heinrich. *Výživa v medicíně a dietetika*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4533-6.
- [25] KATZ, David L., Kim DOUGHTY a Ather ALI. Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2011, **15**(10), 2779-2811 [cit. 2019-01-

- 19]. DOI: 10.1089/ars.2010.3697. ISSN 1523-0864. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2010.3697>
- [26] STEIDL, Ladislav. Magnezium donor zdraví a pohody. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001, 3(4), 150-152 [cit. 2018-12-30]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/04/02.pdf>
- [27] WEBER, Thomas a Marc SOLIOZ. Evaluation of chocolate as a source of dietary copper. *European Food Research and Technology* [online]. 2014, 238(6), 1063-1066 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1007/s00217-014-2240-x. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-014-2240-x>
- [28] MCFADDEN, Christine a Christine FRANCE. *Velká encyklopedie čokolády: více než 200 receptů*. Praha: Rebo Productions, 1999. ISBN 80-7234-056-5.
- [29] ČOPÍKOVÁ, Jana. *Čokoláda, kakao a výrobky z nich*. 1. vydání. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú. a Potravinářská komora ČR v rámci priorit České technologické platformy pro potraviny, 2015. Jak poznáme kvalitu?. ISBN 978-80-88019-06-0.
- [30] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. První. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0509-9.
- [31] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin*. 2. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1996. Edícia skrípt. ISBN 80-227-0846-1.
- [32] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [33] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-86494-02-0.
- [34] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno. Vysoké učení technické v Brně: Fakulta chemická, ÚCHBPT, 2017.
- [35] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [36] VESPALCOVÁ, Milena. *Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy: Úloha č. 5: HPLC*. Brno. Vysoké učení technické v Brně: Fakulta chemická, ÚCHBPT, 2018.
- [37] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [38] DIVIŠ, Pavel. *Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy: Úloha č. 1: ICP-OES*. Brno. Vysoké učení technické v Brně: Fakulta chemická, ÚCHBPT, 2018.
- [39] STUŽKA, Václav. *Analytická atomová optická spektrometrie*. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 1994.
- [40] NIELSEN, S. *Food analysis*. 4th ed. Dordrecht: Springer, 2010. ISBN 978-1-4419-1477-4.
- [41] DÓKA, O., E. PRÁGAI, D. BICANIC, R. KULCSÁR a Z. AJTONY. Colorimetry and photoacoustic spectroscopy as a suitable tool for determination of fat-free cocoa solids in dark chocolates. *European Food Research and Technology* [online]. 2013, 236(6),

963-968 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1007/s00217-013-1954-5. ISSN 1438-2377.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-013-1954-5>

- [42] KOVAC, Minka, Natasa TOPLAK, Sasa PISKERNIK a Barbara JERSEK, Anja KLANCNIK, ed. PCR in Food Analysis. In: *Polymerase Chain Reaction*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/38551. ISBN 978-953-51-0612-8. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/pcr-in-food-analysis>
- [43] MEGÍAS-PÉREZ, Roberto, Ana Isabel RUIZ-MATUTE, Marcello CORNO a Nikolai KUHNERT. Analysis of minor low molecular weight carbohydrates in cocoa beans by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2019, **1584**, 135-143 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.11.033. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967318314328>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Ar = argon

CF = kofein

CNS = centrální nervová soustava

$(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = dihydrát kyseliny šťavelové

ČMI = český metrologický institut

FAO = *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organizace OSN pro výživu a zemědělství

HCl = kyselina chlorovodíková

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography* – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICP-OES = optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

KM = kakaové máslo

MF = mobilní fáze

NaOH = hydroxid sodný

RF = radiofrekvenční

TB = theobromin

TKS = tukuprostá kakaová sušina

TSD = *total dissolved solids* – množství rozpuštěných pevných látek; uvádí se v $[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$

WHO = *World Health Organization* – Světová zdravotnická organizace